

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-255988
(43)Date of publication of application : 11.09.2002

(51)Int.Cl.

C07H 3/06
A23L 1/09
A23L 1/22
A23L 1/236
A23L 1/30
A23L 1/307
A23L 2/52
A23L 2/00
A61K 7/00
A61K 7/16
A61K 47/10
A61K 47/26
// A61P 3/00
C12N 9/10

(21)Application number : 2001-060460
(22)Date of filing : 05.03.2001

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC
(72)Inventor : KUBOTA MICHIO
NISHIMOTO TOMOYUKI
AGA SO
FUKUDA YOSHIATSU
MIYAKE TOSHIO

(54) SUGAR MIXTURE, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a sugar mixture containing a cyclic tetrasaccharide and a sugar alcohol, to establish a method for producing the same and to provide a use of the sugar mixture.

SOLUTION: This sugar mixture containing a cyclic tetrasaccharide and a sugar alcohol is obtained without having a bad influence upon the cyclic tetrasaccharide being a nonreducing saccharide by hydrogenating a cyclic tetrasaccharide together with a reducing saccharide-containing saccharide. This method for sugar mixture is provided. This use for the sugar mixture is provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-255988

(P2002-255988A)

(43) 公開日 平成14年9月11日 (2002.9.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 H 3/06		C 0 7 H 3/06	4 B 0 1 7
A 2 3 L 1/09		A 2 3 L 1/09	4 B 0 1 8
1/22		1/22	E 4 B 0 4 1
1/236		1/236	A 4 B 0 4 7
			Z 4 B 0 5 0
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 47 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-60460(P2001-60460)

(22) 出願日 平成13年3月5日 (2001.3.5)

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 久保田 倫夫

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
会社林原生物化学研究所内

(72) 発明者 西本 友之

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
会社林原生物化学研究所内

(72) 発明者 阿賀 創

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式
会社林原生物化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖質混合物とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【課題】 環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物、及び、その製造方法を確立し、併せて、この糖質混合物の用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明は、環状四糖とともに還元性糖質を含有する糖質を水素添加して、還元性を低減することにより、非還元性糖質である環状四糖に悪影響を与えることなく、環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物を確立し、併せてその製造方法並びに用途を提供して課題を解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する糖質とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物。

【請求項2】 糖アルコールが、ソルビトール、マルチトール、イソマルチトール及びパニトールから選ばれる1種又は2種以上の糖アルコールである請求項1記載の糖質混合物。

【請求項3】 サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する糖質とともに還元性糖質を含有する糖質を水素添加して還元性を低減させ、次いで精製して得られる請求項1又は2記載の糖質混合物。

【請求項4】 サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する糖質とともに還元性糖質を含有する糖質が、 α -イソマルトシルグルコ糖質に α -イソマルトシル転移酵素を作用させるか、又はDE20以下の澱粉部分分解物に α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを作用させて得られる糖質である請求項3記載の糖質混合物。

【請求項5】 還元性糖質が、グルコース、マルトース、イソマルトース及びパノースから選ばれる1種又は2種以上の還元性糖質であることを特徴とする請求項3又は4記載の糖質混合物。

【請求項6】 糖質混合物が、DE0.5未満であって、その形態がシラップ又は結晶含有粉末である請求項1乃至5の何れかに記載の糖質混合物。

【請求項7】 請求項3乃至5の何れかに記載のサイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する糖質とともに還元性糖質を含有する糖質を水素添加して還元性を低減させる工程、次いで精製し採取する工程を含むことを特徴とする請求項1乃至6の何れかに記載の糖質混合物の製造方法。

【請求項8】 請求項1乃至6の何れかに記載の糖質混合物を含有させた組成物。

【請求項9】 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品である請求項8記載の組成物。

【請求項10】 飲食物が、低カロリー飲食物又は低酸性飲食物である請求項9記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、糖質混合物とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する糖質（当該糖質を、その構造にちなんで、本明細書では、以後、環状四糖と称することもある。）とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物とその製造方法並びに用途に関する。

10 【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、近年、新たな四糖類が報告された。即ち、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第226巻、641乃至648頁（1994年）には、主として4つのグルコース残基が α -1, 3結合と α -1, 6結合で交互に連なっているアルテルナン (alternan) に加水分解酵素アルテルナナーゼ (alternanase) を作用させることにより、サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→6)- α -D-グルコピラノシル-(1→3)- α -D-グルコピラノシル-(1→) の構造を有する環状四糖が生成し、これを有機溶媒の一種であるメタノール共存下で晶出させることが示されている。

20 【0003】 環状四糖は、環状構造を有することから、各種化合物を包接する能力を有するとともに、非還元性故に、アミノカルボニル反応を起こさず、褐変、劣化を懸念することなく各種用途に加工、利用できることが期待される。しかしながら、環状四糖の製造原料としてのアルテルナンや、環状四糖の製造に必要な酵素であるアルテルナナーゼの入手が困難である上、それらを産生する微生物も容易に入手できる状態になかった。

30 【0004】 斯かる状況下、本発明者等は、先に特願2000-229557号明細書で開示したように、パノースなどの α -イソマルトシルグルコ糖質から環状四糖を生成する新規な酵素である α -イソマルトシル転移酵素を発見し、この新規酵素を利用して、澱粉原料から製造されるパノースなどの α -イソマルトシルグルコ糖質からの環状四糖の製造方法を確立した。さらに、本発明者等は、先に特願2000-234937号明細書で開示したように、澱粉原料に α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と前記 α -イソマルトシル転移酵素を組み合わせ作用させることにより、安価な澱粉原料から、直接、環状四糖を効率よく製造する方法を確立した。

40 【0005】 しかしながら、上記した環状四糖の製造方法では、澱粉原料を用いるため、環状四糖とともに、副生するグルコース、マルトース、イソマルトース、パノースなどの還元性糖質を含有する糖質となる。製造された環状四糖を含有する糖質は、環状四糖自体は非還元性

であっても、共存する還元性糖質のために還元性を示す。このため、環状四糖を含有する製品を非還元性とするためには、幾多の精製工程を経て還元性糖質を除去し、高純度の環状四糖製品とする必要がある。

【0006】澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示す糖質（以下、本明細書では、本還元性糖質を還元性澱粉糖と称することもある。）であることが知られている。一般に、還元性澱粉糖は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント（Dextrose Equivalent, DE）として表している。この値の大きいものは、例えば、加工食品などに用いた場合、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、環状四糖と還元性糖質とを含有してなる糖質の欠点を解消するためのものであって、環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる還元性を低減させた糖質混合物、及び、その製造方法を確立し、併せて、この還元性を低減させた糖質混合物の用途を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題を解決するために、環状四糖とともに還元性糖質を含有する糖質の還元性を低減させる方法に着目し、種々研究を続けてきた。その結果、該糖質を水素添加して還元性を低減させることにより、非還元性糖質である環状四糖に悪影響を与えることなく、還元性糖質が対応する糖アルコールに変換され、環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物となり、その後の精製工程も容易であって前記課題を解決できることを見だし、本発明を完成した。

【0009】

【発明の実施の形態】まず、本発明で用いる環状四糖生成酵素としては、パノース若しくはイソマルトシルマルトースのような α -イソマルトシルグルコ糖質から環状四糖を生成する酵素である α -イソマルトシル転移酵素、及び澱粉から α -イソマルトシルグルコ糖質を生成する酵素である α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素があげられる。これら酵素としては、例えば、特願2000-229557号明細書および特願2000-234937号明細書で開示されるバチルス グロビスポルス（*Bacillus globisporus*）C9（FERM BP-7143）、バチルス グロビスポルス（*Bacillus globisporus*）C11（FERM BP-7144）など由来の α -イソ

マルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が好適に用いられる。

【0010】本発明で使用される澱粉は、とうもろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。澱粉を液化するには、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは濃度10w/w%（以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を%と略称する。）以上、更に望ましくは約20乃至50%とし、これを加熱して機械的に液化しても、酸又は酵素で液化してもよい。液化の程度は、比較的低いDE20未満のものが適しており、望ましくはDE15未満、更に望ましくはDE10未満のものが好適である。酸で液化する場合には、例えば、塩酸、磷酸、蔞酸などで液化し、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで必要pHに中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、 α -アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型 α -アミラーゼの使用が適している。

【0011】このようにして得られる澱粉を液化した溶液に、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるには、これら酵素が作用しうるpH、温度で行えばよく、通常、pH4乃至10、好ましくは、pH5乃至8、温度約10乃至80℃、好ましくは、約30乃至70℃で行われる。また、澱粉を液化した溶液にこれら酵素を加える順序は問わず、いずれかの酵素を先に加え、他の酵素をその後に加えて作用させることも、また、これら酵素を同時に加えて作用させることも随意である。

【0012】酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよく、通常、基質である液化澱粉に対して、固形物グラム当たり、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる。このようにして得られる非還元性の環状四糖とともに還元性を示すグルコース、マルトース、イソマルトース、パノースなどの澱粉糖を含む還元性糖質は、本発明の原料用還元性糖質として有利に利用できる。

【0013】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコール及

びアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離などの方法を1種又は2種以上組み合わせることで精製することにより、非還元性の環状四糖含量を高め、かつ残存する還元性澱粉糖含量を低減させた糖質混合物も、また、逆に、還元性澱粉糖含量を高め、かつ残存する非還元性の環状四糖を低減させた糖質も、何れも本発明の原料用還元性糖質として有利に利用できる。

【0014】とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去して、原料用還元性糖質を製造することも有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。このようにして得られる原料用還元性糖質は、環状四糖と還元性糖質との重量比で、通常、1:9.9乃至9.9:1、望ましくは10:9.0乃至9.0:10の範囲にある。

【0015】このようにして得られる環状四糖とともに還元性糖質を含む糖質を水素添加するには、環状四糖を分解することなく、これに含まれる還元性糖質が対応する糖アルコールに還元されればよく、例えば、原料の糖質の濃度を約30乃至70%水溶液にし、オートクレーブに入れ、触媒として、糖質固形物当り、ラネーニッケルを約4乃至10%を添加し、攪拌しながら温度を90乃至150℃に上げて水素添加を完了、望ましくは、実質的に非還元性となるDEを0.5未満に低減させるまで水素添加を行い、次いでラネーニッケルを除去し、更に、常法に従って、活性炭による脱色、イオン交換樹脂による脱塩などの精製工程を経た後、濃縮し、シラップ状製品にすることも、また、シラップを乾燥させて非品質粉末状製品にすることも、更に、シラップを晶出させマスキットとし、これを粉末化して結晶含有粉末製品にすることも随意である。このようにして製造される還元性を低減させた糖質混合物は、環状四糖に加えて、ソルビトール、マルチトール、イソマルチトール及びパニトールから選ばれる1種又は2種以上の糖アルコールを含有している。本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物は、その特徴をさらに引き出すために、環状四糖と糖アルコールとの重量比で、望ましくは1:9.9乃至9.9:1、更に望ましくは10:9.0乃至9.0:10の範囲が好適である。

【0016】本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物（以下、本明細書では、当該混合物を本発明の糖質混合物と称することもある。）は、DE0.5未満と還元性が極めて低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合しても、褐変することも、異

臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により、主成分の環状四糖のみならずマルチトール、イソマルチトール及びパニトールなどのオリゴ糖アルコールは比較的消化吸収されにくく低カロリー甘味料として利用される。また、本発明の糖質混合物は虫歯誘発菌などによって、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。

【0017】また、本発明の糖質混合物は、安定な甘味料であることにより、結晶高含有製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0018】また、本発明の糖質混合物は、甘味料、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、飲食物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0019】また、本発明の糖質混合物は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、パラチニット、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、 α -グリコシルレバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、スクラロース、アセスルファムK、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0020】また、本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物、とりわけ、粉末状製品は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0021】また、本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0022】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、

マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0023】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、コーヒー、紅茶、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席するこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0024】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。

【0025】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、ツモア・ネクロシス・ファクター β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファク

ター、インターロイキン I I などのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCG ワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナナーゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【0026】以上述べたような各種組成物に本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物を含有させる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有させればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常 0.1% 以上、望ましくは 1% 以上含有させるのが好適である。

【0027】次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0028】

【実験 1】＜培養物からの環状四糖の調製＞澱粉部分分解物（商品名『バインデックス #1』、松谷化学株式会社製造）5w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5w/v%、リン酸二カリウム 0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12 水塩 0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05w/v%、および水からなる液体培地 100 ml を、500 ml 容三角フラスコに入れ、オートクレーブで 121℃、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9 (FERM BP-7143) を接種し、27℃、230 rpm で 48 時間回転振盪培養した後、遠心分離して菌体を除き培養上清を得た。さらに、その培養上清をオートクレーブ (120℃、15 分間) し、放冷した後、不溶物を遠心分離して除き上清を回収した。

【0029】得られた上清中の糖質を調べるため、展開溶媒として n-ブタノール、ピリジン、水混液（容量比 6:4:1）、薄層プレートとしてメルク社製『キーゼルゲル 60』（アルミプレート、20×20 cm）を用い 2 回展開するシリカゲル薄層クロマトグラフィー（以下、「TLC」と略す。）を行ない、上清中の糖質を分

離した。検出法として、分離した全糖質を硫酸-メタノール法で発色し、また、還元糖質をジフェニルアミン-アニリン法で発色して調べたところ、Rf値が約0.31の位置に硫酸-メタノール法で陽性、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法で陰性の非還元性糖質が検出された。

【0030】先に得た上清約90mlをpH5.0、温度45℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製菓株式会社製造）を固形物1グラム当たり1,500単位とグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物1グラム当たり75単位添加して24時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムでpHを12に調整し2時間煮沸して、残存する還元糖を分解した。不溶物を濾過して除去した後、三菱化学製イオン交換樹脂『ダイヤイオンPK218』と『ダイヤイオンWA30』を用いて脱色、脱塩し、さらに、三菱化学製カチオン交換樹脂『ダイヤイオンSK-1B』とオルガノ製アニオン交換樹脂『IRA411』で再度脱塩し、活性炭で脱色し、精密濾過した後、エバポレータで濃縮し凍結真空乾燥して固形物として約0.6gの糖質粉末を得た。

【0031】得られた糖質の組成を高速液体クロマトグラフィー法（以下、HPLCと略称する。）で調べたところ、図1に示すように、溶出時間10.84分に単一ピークのみが検出され、純度は99.9%以上で極めて高純度であることが判明した。なお、HPLCは、『ショウデックス（Shodex）KS-801カラム』

（昭和電工株式会社製造）を用いカラム温度60℃、流速0.5ml/min水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。

【0032】また、還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、その還元力は検出限界以下であり、本標品は実質的に非還元性糖質であると判断される。

【0033】

【実験2】＜非還元性糖質の構造解析＞実験1の方法で得られた非還元性糖質について、高速原子衝撃法による質量分析（通称「FAB-MS」）したところ、質量数649のプロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が648であることが判明した。

【0034】また、常法に従って、硫酸を用い加水分解し、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本糖質の構成糖はD-グルコースであることも判明し、質量数を考慮すると、本糖質はD-グルコース4分子からなる環状糖質であることがわかった。

【0035】さらに、本糖質を用いて核磁気共鳴法（通称NMR）を行ったところ、図2に示す¹H-NMRスペクトルと、図3に示す¹³C-NMRスペクトルが得られ、これらスペクトルを既知糖質のものと異同を比較

したところ、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（European Journal of Biochemistry）』、641乃至648頁（1994年）に記載されている非還元性環状糖質サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-（1→3）- α -D-グルコピラノシル-（1→6）- α -D-グルコピラノシル-（1→3）- α -D-グルコピラノシル-（1→）のスペクトルと一致し、本糖質の構造が図4に示す環状四糖、即ち、サイクロ {→6}- α -D-グルコピラノシル-（1→3）- α -D-グルコピラノシル-（1→6）- α -D-グルコピラノシル-（1→3）- α -D-グルコピラノシル-（1→）であることが判明した。

【0036】

【実験3】＜バチルス グロビスポルス C9からの α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産＞澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』（アサヒビール株式会社製造）1.8w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、および水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0037】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.45単位/mlで、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.5単位/mlで、環状四糖生成活性は約0.95単位/mlであり、遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収した上清約18lの酵素活性を測定したところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0.45単位/mlの活性（総活性約8,110単位）で、 α -イソマルトシル転移酵素は約1.5単位/mlの活性（総活性約26,900単位）で、環状四糖生成活性は約0.95単位/ml（総活性約17,100単位）であった。

【0038】なお、酵素活性は次のようにして測定した。即ち、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度2w/v%となるよう100mM酢酸緩衝液（pH6.0）に溶解させて基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で60分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成するイソマルトシルマルトースとマルトースのう

ち、このマルトース量を、実験 1 に記載の HPLC 法で定量することによって行った。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1μ モルのマルトースを生成する酵素量とした。

【0039】また、 α -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度 2 w/v % となるよう 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ基質液とし、その基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、35℃で 30 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成する環状四糖とグルコースのうち、このグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することによって行った。 α -イソマルトシル転移酵素の活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1μ モルのグルコースを生成する酵素量とした。

【0040】環状四糖生成活性の測定は、澱粉部分分解物 (商品名『パインデックス #100』、松谷化学株式会社製造) を濃度 2 w/v % となるよう 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ基質液とし、その基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、35℃で 60 分間酵素反応し、その反応液を 100℃で 10 分間熱処理して反応を停止させた後、更に、 α -グルコシダーゼ (商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬製造) 70 単位/ml とグルコアミラーゼ (ナガセ生化学工業株式会社販売) 27 単位/ml とを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml を加えて、50℃で 60 分間処理し、その液を 100℃で 10 分間熱処理して酵素を失活させた後、環状四糖量を実験 1 に記載の HPLC 法で定量することによって行った。環状四糖生成活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1μ モルの環状四糖を生成する酵素量とした。

【0041】

【実験 4】<バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の調製>

【実験 4-1】<バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の精製>実験 3 で得られた培養上清約 18 l を 80% 飽和硫酸液で塩析して 4℃、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収し 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 400 ml を得た。この粗酵素液は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を 8,110 単位と、 α -イソマルトシル転移酵素活性を 24,700 単位と、環状四糖生成活性を約 15,600 単位有していた。この粗酵素液を三菱化学株式会社製『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィー (ゲル容量 1,000 ml) に供した。この際、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、 α -イソマルトシル転移酵素および環状四糖のいずれも、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルに

吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不純物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース 0 mM から 100 mM のリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とは分離して溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約 0 M 付近に溶出し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 30 mM 付近に溶出した。そこで、 α -イソマルトシル転移酵素活性画分と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め回収した。また、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と α -イソマルトシル転移酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

【0042】以下、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

【0043】

【実験 4-2】< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製>実験 4-1 で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表 1 に示す。

【0044】

* * 【表1】

工 程	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	8, 110	0.12	100
硫酸塩析後の透析液	7, 450	0.56	91.9
イオン交換カラム溶出液	5, 850	1.03	72.1
アフィニティークラム溶出液	4, 040	8.72	49.8
疎水カラム溶出液	3, 070	10.6	37.8
アフィニティークラム溶出液	1, 870	13.6	23.1

【0045】精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0046】

【実験4-3】< α -イソマルトシル転移酵素の精製>実験4-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した α -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルトヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチル※

※ートヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表2に示す。

【0047】

【表2】

工 程	α -イソマルトシル転移酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシル転移酵素比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	26, 900	0.41	100
硫酸塩析後の透析液	24, 700	1.85	91.8
イオン交換カラム溶出液	19, 400	3.41	72.1
アフィニティークラム溶出液	13, 400	18.6	49.8
疎水カラム溶出液	10, 000	21.3	37.2
アフィニティークラム溶出液	6, 460	26.9	24.0

【0048】

【実験5】< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および α -イソマルトシル転移酵素の性質>

【実験5-1】< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質>実験4-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約140,000 \pm 20,000ダルトンであった。

【0049】精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アンフォライン(アマシャム・ファ

ルマシア・バイオテック社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.2 \pm 0.5であった。

【0050】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、Ca²⁺非存在下と1mM存在下で測定した。これらの結果を図5(温度の影響)、図6(pHの影響)を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、60分間反応で約40℃(Ca²⁺非存在)、約45℃(Ca²⁺1mM存在)、至適pHは、35℃、60分間反応で約6.0乃至6.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(20mM酢酸緩衝液、pH6.0)をCa²⁺

非存在下または 1 mM 存在下で各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4℃、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図 7（温度安定性）、図 8（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 35℃ まで*

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	4
Zn ²⁺	92	Ba ²⁺	65
Mg ²⁺	100	Sr ²⁺	80
Ca ²⁺	115	Pb ²⁺	103
Co ²⁺	100	Fe ³⁺	98
Cu ²⁺	15	Fe ²⁺	97
Ni ²⁺	98	Mn ²⁺	111
Al ³⁺	99	EDTA	20

【0053】表 3 の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg²⁺、Cu²⁺、EDTA で著しく阻害され、Ba²⁺、Sr²⁺ で阻害された。Ca²⁺、Mn²⁺ で活性化されることも判明した。

【0054】本酵素の N 末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー モデル 473A（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンの N 末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0055】

【実験 5-2】＜α-イソマルトシル転移酵素の性質＞ 30
実験 4-3 の方法で得た精製 α-イソマルトシル転移酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w/v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 112,000 ± 20,000 ダルトンであった。

【0056】精製 α-イソマルトシル転移酵素標品を 2 w/v % アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電

*（Ca²⁺ 非存在）、約 40℃ まで（Ca²⁺ 1 mM 存在）で、pH 安定性は約 4.5 乃至 9.0 であった。

【0051】本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 3 に示す。

【0052】

【表 3】

気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は pI 約 5.5 ± 0.5 であった。

【0057】本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図 9（温度の影響）、図 10（pH の影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、30 分間反応で約 45℃、至適 pH は、35℃、30 分間反応で約 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0）を各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4℃、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図 11（温度安定性）、図 12（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 40℃ までで、pH 安定性は約 4.0 乃至 9.0 であった。

【0058】本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 4 に示す。

【0059】

【表 4】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	1
Zn ²⁺	88	Ba ²⁺	102
Mg ²⁺	98	Sr ²⁺	101
Ca ²⁺	101	Pb ²⁺	89
Co ²⁺	103	Fe ²⁺	96
Cu ²⁺	57	Fe ³⁺	105
Ni ²⁺	102	Mn ²⁺	106
Al ³⁺	103	EDTA	104

【0060】表4の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg²⁺で著しく阻害され、Cu²⁺で阻害された。また、Ca²⁺で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

【0061】本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列のイソロイシニアスパラギン酸-グリシン-バリン-チロシン-ヒスチジン-アラニン-プロリン-アスパラギン-グリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0062】

【実験6】＜バチルス グロビスポルス C11からのα-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産＞澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、および水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C11（FERM BP-7144）を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0063】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約0.55単位/mlで、α-イソマルトシル転移酵素活性は約1.8単位/mlで、環状四糖生成活性は約1.1単位/mlであり、遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収した上清約18lの酵素活性を測定したところ、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0.51単位/mlの活性（総活性約9,180単位）で、α-イソマルトシル転移酵素は約1.7単位/mlの活性（総活性約30,400単位）で、環状四糖生成活性は約1.1単位/ml（総活性約19,40

0単位）であった。

【0064】

【実験7】＜バチルス グロビスポルス C11由来酵素の調製＞

【実験7-1】＜バチルス グロビスポルス C11由来酵素の精製＞実験6で得られた培養上清約18lを80%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収し10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416mlを得た。この粗酵素液は、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8,440単位、α-イソマルトシル転移酵素活性を約28,000単位、環状四糖生成活性を約17,700単位を有することが判明した。この粗酵素液を、実験4-1に記載の『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性、α-イソマルトシル転移酵素活性、環状四糖生成いずれも、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー（ゲル量500ml）に供した。酵素活性は、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース0mMから100mMのリニアグラジエントで溶出させたところ、α-イソマルトシル転移酵素とα-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は分離して溶出し、α-イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0.3M付近で溶出し、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約30mM付近で溶出した。そこで、α-イソマルトシル転移酵素活性画分とα-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを別々に集

め回収した。実験4に記載のC9株の場合と同様に、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた α -イソマルトシル転移酵素画分と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

【0065】以下、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

【0066】

【実験7-2】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東*

*ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

【0067】

【表5】

工 程	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収 率 (%)
培養上清	9,180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8,440	0.60	91.9
イオン交換カラム溶出液	6,620	1.08	72.1
アフィニティークラム溶出液	4,130	8.83	45.0
疎水カラム溶出液	3,310	11.0	36.1
アフィニティークラム溶出液	2,000	13.4	21.8

【0068】精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0069】

【実験7-3】 α -イソマルトシル転移酵素の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した α -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチル

ートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表6に示す。

【0070】

【表6】

工 程	α -イソマルト シル転移酵素活 性量 (単位)	α -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティーカラム溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティーカラム溶出液	5,510	29.6	18.1

【0071】

【実験8】＜ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び α -イソマルトシル転移酵素の性質＞

【実験8-1】＜ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質＞実験7-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約137,000±20,000ダルトンであった。

【0072】精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.2±0.5であった。

【0073】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、 Ca^{2+} 非存在下と1mM存在下で測定した。こ*

*これらの結果を図13（温度の影響）、図14（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、60分間反応で約45℃（ Ca^{2+} 非存在）、約50℃（ Ca^{2+} 1mM存在）、至適pHは、35℃、60分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を Ca^{2+} 非存在下または1mM存在下で各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図15（温度安定性）、図16（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃まで（ Ca^{2+} 非存在）、約45℃まで（ Ca^{2+} 1mM存在）で、pH安定性は約5.0乃至10.0であった。

【0074】本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表7に示す。

【0075】

【表7】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg^{2+}	4
Zn^{2+}	91	Ba^{2+}	65
Mg^{2+}	98	Sr^{2+}	83
Ca^{2+}	109	Pb^{2+}	101
Co^{2+}	96	Fe^{2+}	100
Cu^{2+}	23	Fe^{3+}	102
Ni^{2+}	93	Mn^{2+}	142
Al^{3+}	100	EDTA	24

【0076】表7の結果から明らかなように、本酵素活性は、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、EDTAで著しく阻害され、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} で阻害された。 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} で活性化されることも判明した。

【0077】本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列N末端チロシン-

バリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0078】このN末端アミノ酸配列結果を実験5-1のパチルス・グロビスポルスC9由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のN末端配列と比較すると同一であることが判明し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

【0079】

【実験8-2】 α -イソマルトシル転移酵素の性質> 実験7-3の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約102,000 \pm 20,000ダルトンであ

った。
【0080】精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・*

* バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.6 \pm 0.5であった。

【0081】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図17（温度の影響）、図18（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約50℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約5.5乃至6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図19（温度安定性）、図20（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃まで、pH安定性は約4.5乃至9.0であった。

【0082】本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表8に示す。

【0083】

【表8】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	2
Zn ²⁺	83	Ba ²⁺	90
Mg ²⁺	91	Sr ²⁺	93
Ca ²⁺	91	Pb ²⁺	74
Co ²⁺	89	Fe ²⁺	104
Cu ²⁺	56	Fe ³⁺	88
Ni ²⁺	89	Mn ²⁺	93
Al ³⁺	89	EDTA	98

【0084】表8の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg²⁺で著しく阻害され、Cu²⁺で阻害された。また、Ca²⁺で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

【0085】本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。このN末端アミノ酸配列結果を実験5-2のパチルス・グロビスポルスC9由来の α -イソマルトシル転移酵素のN末端配列と比較して、 α -イソマルトシル転移酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号4

に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

【0086】

【実験9】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のアミノ酸配列>

【実験9-1】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の内部部分アミノ酸配列> 実験7-2の方法で得られた精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品の一部を10mMトリスー塩酸緩衝液（pH9.0）に対して、透析した後、同緩衝液で約1mg/mlの濃度になるように希釈した。この試料液（1ml）に10 μ gのトリプシン（和光純薬株式会社販売）を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行なった。

マイクロボンダパック C18 カラム (直径 2.1 mm × 長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 8 % アセトニトリル溶液から 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 40 % アセトニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P64 (保持時間約 6.4 分)、P88 (保持時間約 8.8 分)、*

* P99 (保持時間約 9.9 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200 μ l の 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 50 % アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 5 乃至 7 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 9 に示す。

【0087】

【表 9】

ペプチド名	内部部分アミノ酸配列
P64	アスパラギン酸-アラニン-セリン-アラニン-アスパラギン-バリン-スレオニン-スレオニン
P88	トリプトファン-セリン-ロイシン-グリシン-フェニルアラニン-メチオニン-アスパラギン-フェニルアラニン
P99	アスパラギン-チロシン-スレオニン-アスパラギン酸-アラニン-トリプトファン-メチオニン-フェニルアラニン

【0088】

【実験 9-2】 < α -イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列> 実験 7-3 の方法で得られた精製 α -イソマルトシル転移酵素標品の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 mg/ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 10 μ g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30℃、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行なった。マイクロボンダパック C18 カラム (直径 2.1 mm × 長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 8 % アセトニトリル溶液から 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 40 % アセ

※ トニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P22 (保持時間約 2.2 分)、P63 (保持時間約 6.3 分)、P71 (保持時間約 7.1 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200 μ l の 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 50 % アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 8 乃至 10 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 10 に示す。

【0089】

【表 10】

ペプチド名	内部部分アミノ酸配列
P22	グリシン-アスパラギン-グルタミン酸-メチオニン-アルギニン-アスパラギン-グルタミン-チロシン
P63	イソロイシン-スレオニン-スレオニン-トリプトファン-プロリン-イソロイシン-グルタミン酸-セリン
P71	トリプトファン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-トリプトファン-メチオニン-セリン

【0090】

【実験 10】 <各種糖質への作用> 各種糖質を用いて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質になりうるかどうかの試験をした。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース、 α - α -トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルクトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシドを含む溶液を調製した。

【0091】 これらの溶液に、実験 4-2 の方法で得た

バチルス グロビスポルス C9 由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、または実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C11 由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を基質固形物 1 グラム当たりそれぞれ 2 単位ずつ加え、基質濃度を 2 w/v % になるように調整し、これを 30℃、pH 6.0 で 24 時間作用させた。酵素反応前後の反応液を、実験 1 記載の TLC 法で分析し、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果を表 11 に示す。

【0092】

【表 11】

基 質	酵素作用		基 質	酵素作用	
	C9酵素	C11酵素		C9酵素	C11酵素
マルトース	+	+	ニゲロース	+	+
マルトトリオース	++	++	ネオトレハロース	+	+
マルトテトラオース	+++	+++	セロビオース	-	-
マルトペンタオース	+++	+++	ゲンチビオース	-	-
マルトヘキサオース	+++	+++	マルチトール	-	-
マルトヘプタオース	+++	+++	マルトトリイトール	+	+
イソマルトース	-	-	ラクトース	-	-
イソマルトトリオース	-	-	スクロース	-	-
パノース	-	-	エルロース	+	+
イソパノース	++	++	セラギノース	-	-
α 、 α -トレハロース	-	-	マルトシルグルコシド	++	++
コージビオース	+	+	イソマルトシルグルコシド	-	-

注) 酵素反応前後で、

「-」は、変化無しを示し、

「+」は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物が認められるを示し、

「++」は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物が認められるを示し、

「+++」は、基質のスポットがほとんど消失し、他の生成物が認められるを示す。

【0093】表11の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、試験した多種の糖質のうち、グルコース重合度3以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質によく作用することが判明した。また、グルコース重合度が2の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイトール、エルロースにも僅かに作用することが判明した。

【0094】

【実験11】＜マルトオリゴ糖からの生成物＞

【実験11-1】＜生成物の調製＞濃度1%のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースのそれぞれ水溶液に実験7-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、それぞ

れ固形物1グラム当たり2単位（マルトースおよびマルトトリオース）、0.2単位（マルトテトラオース）、0.1単位（マルトペンタオース）加え、35℃、pH6.0で8時間作用させ、100℃で10分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の糖組成を、HPLC法を用いて測定した。HPLCは、『YMC Pack ODS-AQ303』カラム（株式会社ワイ・エム・シー製造）を用いカラム温度40℃、流速0.5ml/min水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。その結果を表12に示す。

【0095】

【表12】

反応で生成した糖質の種類	基 質			
	マルトース	マルトトリオース	マルトテトラオース	マルトペンタオース
グルコース	8.5	0.1	0.0	0.0
マルトース	78.0	17.9	0.3	0.0
マルトトリオース	0.8	45.3	22.7	1.9
マルトテトラオース	0.0	1.8	35.1	19.2
マルトペンタオース	0.0	0.0	3.5	34.4
マルトヘキサオース	0.0	0.0	0.0	4.6
イソマルトース	0.5	0.0	0.0	0.0
グルコシルマルトース	8.2	1.2	0.0	0.0
グルコシルマルトトリオース	2.4	31.5	6.8	0.0
X	0.0	2.1	30.0	11.4
Y	0.0	0.0	1.4	26.8
Z	0.0	0.0	0.0	1.7
その他	0.6	0.1	0.2	0.0

表中の

グルコシルマルトースは、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^1-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）で、
 グルコシルマルトトリオースは、 α -イソマルトシルグルコ（別名、 $6^1-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）で、
 Xは、実験11-2で記載の α -イソマルトシルグルコトリオース（別名、 $6^1-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）で、
 Yは、実験11-2で記載の α -イソマルトシルグルコテトラオース（別名、 $6^1-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース）で、
 Zは、未同定の糖質である。

【0096】表12の結果から明らかなように、本酵素の作用の結果、基質マルトースからは、主にグルコースと α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）とが生成し、基質マルトトリオースからは、主にマルトースと α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）とが生成し、少量ながらグルコース、マルトテトラオース、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）、生成物Xが生成することが判明した。基質マルトテトラオースからは、主にマルトトリオースと生成物Xとが生成し、少量ながらマルトース、マルトペンタオース、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）、生成物Yが生成することが判明した。基質マルトペンタオースからは、主にマルトテトラオースと生成物Yとが生成し、少量ながらマルトトリオース、マルトヘキサオース、生成物X、生成物Zが生成することが判明した。

【0097】基質マルトテトラオースからの主生成物である生成物X、並びに基質マルトペンタオースからの主*

20* 生成物である生成物Yの単離・精製を行った。分取用HPLCカラム『YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A』（株式会社ワイエムシイ製）を用いて精製し、上記のマルトテトラオースからの反応物、マルトペンタオースからの反応物それぞれから、純度99.9%以上の生成物X標品を固形物収率約8.3%で、純度99.9%以上の生成物Yを固形物収率約11.5%で単離した。

【0098】

30 【実験11-2】＜生成物の構造解析＞実験11-1の方法で得た生成物X標品および生成物Y標品を用いて、常法に従ってメチル化分析とNMR分析を行なった。メチル化分析の結果は表13にまとめた。NMR分析の結果については、 1H -NMRスペクトルを図21（生成物X）、図22（生成物Y）に、 ^{13}C -NMRスペクトルおよび帰属を図23（生成物X）、図24（生成物Y）、表14にまとめた。

【0099】

【表13】

分析メチル化物の種類	組成比	
	生成物X	生成物Y
2, 3, 4-トリメチル化物	1.00	1.00
2, 3, 6-トリメチル化物	8.05	3.98
2, 3, 4, 6-テトラメチル化物	0.82	0.85

【0100】これらの結果から、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によるマルトテトラオースからの生成物Xは、マルトテトラオースの非還元末端グルコースの6位水酸基にグルコース基が α 結合した5糖で、構造式1で表わされる α -イソマルトシルマルトトリオース

（別名、 $6^1-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）であることが判明した。

【0101】構造式1： $\alpha D-Glc p (1\rightarrow6) \alpha D-Glc p (1\rightarrow4) \alpha D-Glc p (1\rightarrow4) \alpha D-Glc p (1\rightarrow4) D-Glc p$

【0102】また、マルトペンタオースからの生成物Yは、マルトペンタオースの非還元末端グルコースの6位水酸基にグルコシル基が α 結合した6糖で、構造式2で表わされる α -イソマルトシルマルトテトラオース(別名、6⁵-O- α -グルコシルマルトペンタオース)であることが判明した。

* 【0103】構造式2： α D-Glcp (1 \rightarrow 6) α D-Glcp (1 \rightarrow 4) α D-Glcp (1 \rightarrow 4) α D-Glcp (1 \rightarrow 4) α D-Glcp (1 \rightarrow 4) D-Glcp

【0104】

* 【表14】

		NMR化学シフト値 (ppm)	
グルコース番号	炭素番号	生成物X	生成物Y
a	1a	100.8	100.8
	2a	74.2	74.2
	3a	75.8	75.7
	4a	72.2	72.2
	5a	74.5	74.5
	6a	63.2	63.1
b	1b	102.6	102.6
	2b	74.2	74.2
	3b	75.8	75.7
	4b	72.1	72.1
	5b	74.0	74.0
	6b	68.6	68.6
c	1c	102.3	102.3
	2c	74.2	74.2
	3c	76.0	76.0
	4c	79.6	79.5
	5c	73.9	73.9
	6c	63.2	63.1
d	1d	102.2	102.3
	2d	74.0 (α), 74.4 (β)	74.2
	3d	76.0	76.0
	4d	79.8	79.5
	5d	73.9	73.9
	6d	63.2	63.1
e	1e	94.6 (α), 98.5 (β)	102.1
	2e	74.2 (α), 76.7 (β)	74.0 (α), 74.4 (β)
	3e	75.9 (α), 78.9 (β)	76.0
	4e	79.6 (α), 79.4 (β)	79.8
	5e	72.6 (α), 77.2 (β)	73.9
	6e	63.4 (α), 63.4 (β)	63.1
f	1f		94.6 (α), 98.5 (β)
	2f		74.2 (α), 76.7 (β)
	3f		76.0 (α), 78.9 (β)
	4f		79.6 (α), 79.5 (β)
	5f		72.6 (α), 77.2 (β)
	6f		63.3 (α), 63.3 (β)

【0105】以上のことから、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のマルトオリゴ糖に対する作用は以下のように判断された。

【0106】(1) 本酵素は、基質として、 α -1, 4結合からなるグルコース重合度が2以上のマルトオリ

ゴ糖に作用し、その非還元性末端のグルコシル残基を他の分子の非還元性末端のグルコシル残基の6位に転移する作用を有する分子間の6-グルコシル転移を触媒して、非還元末端に6-O- α -グルコシル基を有するグルコース重合度が1増加した α -イソマルトシルグルコ

糖質（別名、6-O- α -グルコシルマルトオリゴ糖）と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを生成する。

（2）本酵素は、4-グルコシル転移も僅かに触媒し、マルトオリゴ糖から、グルコース重合度が1増加したマルトオリゴ糖と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを僅かに生成する。

【0107】

【実験12】＜還元力生成試験＞ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が還元力生成能を有するかどうかを調べるため、以下の試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たバチルス

グロビスポルス C9由来の精製 α -イソマルトシルグル*

$$\text{還元力生成率 (\%)} = \left[\frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} \right] - \left[\frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right] \times 100$$

【0109】結果を表15に示す。

※【表15】

【0110】

※

反応時間 (時間)	還元力生成率 (%)	
	C9 酵素	C11 酵素
0	0.0	0.0
1	0.0	0.1
2	0.1	0.0
4	0.1	0.1
8	0.0	0.0

【0111】表15の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、マルトテトラオースを基質として作用させると、反応物の還元力を実質的に増加しないこと、即ち、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は加水分解作用を示さないか若しくは検出できないほど僅かなものであることが判明した。

【0112】

【実験13】＜デキストラン生成試験＞ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素がデキストラン生成作用を有するかどうかを調べるため、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience Biotechnology and Biochemistry)』、第56巻、169乃至173 (1992年) に記載の方法に準じて試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たC9株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および実験7-2の方法で得たバチルス

グロビスポルス C11株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物1グラム当たり0.25単位加え、35℃、pH6.0で4時間および8時間作用させた後、100℃で15分間保持して反応

* コ糖質生成酵素および実験7-2の方法で得たバチルスグロビスポルスC11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物1グラム当たり0.25単位加え、35℃、pH6.0で作用させ、その反応液の一部を経時的に採り、100℃で10分間保持して反応を停止し、反応液の還元力を測定した。即ち、その酵素反応前後の溶液の還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定し、また、同時にその酵素反応前後の溶液の全糖量をアントロン硫酸法で測定し、還元力生成率 (%) は以下の計算式を用いて算出した。

【0108】

【数1】計算式：

を停止した。その酵素反応液の50 μ lを遠心管に入れ、それに3倍量のエタノールを加え十分に攪拌した後、4℃で30分間静置した。次いで、遠心分離 (15,000rpm、5分間) し、その上清を除去した後、1mlの75w/w%のエタノールを加え攪拌して洗浄した。再度、遠心分離してその上清を除き、真空乾燥した後、1mlの脱イオン水を加え十分に攪拌した。その液中の全糖量 (グルコース換算) をフェノール硫酸法で測定し、試験の全糖量とした。反応のブランクとして、100℃で10分間熱処理し失活させたバチルスグロビスポルス C9由来またはバチルスグロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて同様にを行い、ブランクの全糖量とした。デキストラン生成量は以下の計算式で計算した。

【0113】計算式：

$$\text{デキストラン生成量 (mg/ml)} = [(\text{試験の全糖量}) - (\text{ブランクの全糖量})] \times 20$$

【0114】結果を表16に示す。

【0115】

【表16】

反応時間 (時間)	生成デキストラン (mg/ml)	
	C 9 酵素	C 1 1 酵素
4	0. 0	0. 0
8	0. 0	0. 0

【0116】表16の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトテトラオースに作用させてもデキストランを生成しないこと、つまり、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、デキストラン生成作用を実質的に有さないか、その生成量は検出限界以下であることが判明した。

【0117】

【実験14】＜転移受容体特異性＞各種糖質を用いて、本酵素の転移受容体になりうるかどうかの試験をした。D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル α -グルコシド、メチル β -グルコシド、N-アセチルグルコサミン、ソルビトール、 α 、 α -トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルクトール、ラクトース、スクロース、 α -サイクロデキストリン、 β -サイクロデキストリン、 γ -サイクロデキストリンの溶液を調製した。

【0118】これらの受容体溶液（濃度1.6%）に、糖供与体として澱粉部分分解物『パインデックス#100』（濃度4%）を加え、実験4-2の方法で得たバチルスグロビスポルス C9由来の精製 α -イソマルトシ

ルグルコ糖質生成酵素標品または実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を糖供与体固形物1グラム当たりそれぞれ1単位ずつ加え、これを30℃、pH6.0で24時間作用させた。酵素反応後の反応液を、受容体が単糖または二糖の場合はガスクロマトグラフィー法（以下、「GLC法」と略する。）で、受容体が三糖以上の場合はHPLC法で分析し、それぞれの糖質が本酵素の転移受容体になるかを確認した。なお、GLCに於いて、GLC装置は『GC-16A』（株式会社島津製作所製）、カラムはジー・エル・サイエンス株式会社製『2%シリコンOV-17/クロモゾルプW』を充填したステンレス製カラム（3mm ϕ ×2m）、キャリアーガスは窒素ガスを流量40ml/分で160℃から320℃まで7.5℃/分の速度で昇温し、検出は水素炎イオン検出器で分析した。HPLCでは、HPLCの装置は東ソー株式会社製『CCPD』、カラムは『ODS-AQ-303』（株式会社ワイエムシー社製）、溶離液は水を流速0.5ml/分で、検出は示差屈折形で分析した。結果を表17に示す。

【0119】

【表17】

10

20

30

糖質	転移生成物		糖質	転移生成物	
	C9酵素	C11酵素		C9酵素	C11酵素
D-グルコース	+	+	ソルビトール	-	-
D-キシロース	++	++	α 、 α -トレハロース	++	++
L-キシロース	++	++	イソマルトース	++	++
D-ガラクトース	+	+	イソマルトトリオース	++	++
D-フラクトース	+	+	セロビオース	++	++
D-マンノース	-	-	ゲンチビオース	++	++
D-アラビノース	±	±	マルチトール	++	++
D-フコース	+	+	ラクトース	++	++
L-ソルボース	+	+	スクロース	++	++
L-ラムノース	-	-	α -シクロデキストリン	-	-
メチル- α -グルコース	++	++	β -シクロデキストリン	-	-
メチル- β -グルコース	++	++	γ -シクロデキストリン	-	-
N-アセチルグルコサミン	+	+			

表中の

「-」は、受容体への糖転移物が検出されなかったを示し、

「±」は、受容体への糖転移物が検出されたが、その生成量が1%未満であったを示し、

「+」は、受容体への糖転移物が1以上10%未満であったを示し、

「++」は、受容体への糖転移物が10%以上であったを示す。

【0120】表17の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、転移受容体として種々の糖質が利用でき、特に、D-／L-キシロース、メチル- α -グルコシド、メチル- β -グルコシド、 α 、 α -トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、ラクトースおよびスクロースによく転移し、次いで、D-グルコース、D-フラクトース、D-フコース、L-ソルボースおよびN-アセチルグルコサミンに転移し、更には、D-アラビノースにも転移することが判明した。

【0121】以上に述べた α -イソマルトシルグルコ糖*40

*質生成酵素の性質について、先に報告されている6-グルコシル転移作用を有する酵素、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience Biotechnology and Biochemistry)』、第56巻、第169乃至173頁(1992年)に記載のデキストリン・デキストラナーゼおよび『日本農芸化学会誌』、第37巻、第668乃至672頁(1963年)に記載のトランスグルコシダーゼと比較した。その結果を表18にまとめた。

【0122】

【表18】

性質	本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素		デキストリン・デキストラナーゼ (対照)	トランスグルコシダーゼ (対照)
	C9酵素	C11酵素		
加水分解能	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	主に加水分解する
デキストラン生成能	生成しない	生成しない	生成する	生成しない
至適pH	6.0-6.5	6.0	4.0-4.2	3.5
EDTAによる阻害	阻害される	阻害される	阻害されない	阻害されない

【0123】表18から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、既知のデキストリン・デキストラナーゼやトランスグルコシダーゼとは全く異なる新規な理化学的性質を有することが判明した。

【0124】

【実験15】＜環状四糖の生成＞各種糖質を用いて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および α -イソマルトシル転移酵素の作用による環状四糖生成試験を行った。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、アミロース、可溶性澱粉、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#100』、松谷化学株式会社製）またはグリコーゲン（カキ由来、和光純薬株式会社販売）の溶液を調製した。

【0125】これらの水溶液（濃度0.5%）に、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位とを加え、これらを30℃、pH6.0で作用させ*20

*た。作用条件は、以下の4つの系で行った。

【0126】（1） α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活し、続いて、 α -イソマルトシル転移酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

（2） α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時に24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

（3） α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

（4） α -イソマルトシル転移酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

【0127】これら熱失活させた反応液中の環状四糖の生成量を調べるために、実験1と同様の α -グルコシダーゼ・グルコアミラーゼ処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表19に示す。

【0128】

【表19】

基 質	環状四糖生成量 (%)			
	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素作用の後、 α -イソマルトシル転移酵素を作用	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時作用	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみの作用	α -イソマルトシル転移酵素のみの作用
マルトース	4.0	4.2	0.0	0.0
マルトトリオース	10.2	12.4	0.0	0.0
マルトテトラオース	11.3	21.5	0.0	0.0
マルトペンタオース	10.5	37.8	0.0	0.0
アミロース	3.5	31.6	0.0	0.0
可溶性澱粉	5.1	38.2	0.0	0.0
澱粉部分分解物	6.8	63.7	0.0	0.0
グリコーゲン	10.2	86.9	0.0	0.0

【0129】表19の結果から明らかなように、試験したいずれの糖質も、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみの作用および α -イソマルトシル転移酵素のみの作用では、環状四糖は全く生成しなかったのに対して、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素を同時併用することにより環状四糖が生成した。その生成量は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させた後に α -イソマルトシル転移酵素を作用させた場合には、約11%以下と比較的に低いものに対して、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時に作用させる

と、いずれの糖質でも環状四糖の生成量は向上し、特に、グリコーゲンでは約87%に増加し、澱粉部分分解物では約64%に増加することが判明した。

【0130】この α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用における環状四糖の生成メカニズムは、両酵素の反応特性から以下のように推察される。

【0131】（1） α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、グリコーゲンや澱粉部分分解物などの α -1,4グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の α -1,4グルカン鎖の非還元

末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に α -イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖が生成する。

(2) α -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖が生成する。

(3) 続いて、 α -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を α -1, 4グルカン鎖から切り離し、環状化して環状四糖が生成する。

(4) 切り離された α -1, 4グルカン鎖は、再度、(1)から(3)の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用で、上記のように両酵素が繰り返し作用し、環状四糖の生成量が増加すると推察された。

* 【0132】

【実験16】＜澱粉液化程度の影響＞とうもろこし澱粉を濃度15%澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを0.1%加えてpH6.0に調整し、 α -アミラーゼ（商品名『ターマミール60L』（ノボ社製）を澱粉1グラム当り0.2乃至2.0%を加え、95℃で10分間反応させ、次いで、120℃で20分間オートクレープし、約35℃に急冷して、DE3.2乃至20.5の液化溶液を得、これに、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり2単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり20単位とを加え、35℃で24時間反応させた。100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表20に示す。

10 【0133】

【表20】

*

α -アミラーゼ使用量 澱粉当り (%)	D E	環状四糖生成率 (%)
0.2	3.2	54.5
0.4	4.8	50.5
0.6	7.8	44.1
1.0	12.5	39.8
1.5	17.3	34.4
2.0	20.5	30.8

【0134】表20の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とによる環状四糖の生成は、澱粉の液化の程度で影響を受け、液化の程度が低いほど、即ち、DEが低値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率は高く、逆に、液化の程度が高いほど、即ち、DEが高値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率が低いことが判明した。澱粉からの環状四糖の生成率を高めるには、澱粉の部分分解の程度はDE約20以下、望ましくは、DE約12以下、更に望ましくは、DE約5以下が適していることが判明した。

40 【0135】

【実験17】＜澱粉部分分解物濃度の影響＞澱粉部分分解物『パインデックス#100』（DE約2乃至5）の

最終濃度0.5乃至40%の水溶液を調製し、それぞれに、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス

C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当り10単位加え、両酵素を同時併用して30℃、pH6.0で48時間作用させた後、100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表18に示す。

【0136】

【表21】

パインデックス濃度 (%)	環状四糖生成量 (%)
0.5	63.6
2.5	62.0
5	60.4
10	57.3
15	54.6
20	51.3
30	45.9
40	39.5

【0137】表21の結果から明らかなように、澱粉部分分解物の濃度が0.5%の低濃度では、環状四糖の生成量は約64%であるのに対し、濃度40%の高濃度では、環状四糖の生成量は約40%と、基質である澱粉部分分解物の濃度に依存して環状四糖の生成量が変化することが判明した。この結果から、環状四糖の生成量は、澱粉部分分解物が低濃度であるほど高まる傾向にあることが判明した。

【0138】

【実験18】＜シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ添加効果＞澱粉部分分解物『パインデックス#100』水溶液（濃度15%）を調製し、実験7-2の方法で得たパチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物*

* 1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たC11株由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位と、パチルス・ステアロサーモフィルス由来シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）を固形物1グラム当たり0乃至0.5単位加え、両酵素を同時併用して30℃、pH6.0で48時間作用させた後、100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表22に示す。

【0139】

【表22】

CGTase添加量(単位)	環状四糖生成量 (%)
0	54.6
2.5	60.1
5	63.1
10	65.2

【0140】表22の結果から明らかなように、CGTaseを添加することによって、環状四糖の生成量が増加することが判明した。

【0141】

【実験19】＜環状四糖の調製＞トウモロコシ由来フィトグリコーゲン（キューピー株式会社製）の水溶液（約1001）を濃度4w/v%、pH6.0、温度30℃に調整した後、実験7-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位加え、48時間作用させた後、100℃で10分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、HP

LCで環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約84%であった。この反応液をpH5.0、温度45℃に調整した後、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、さらに、水酸化ナトリウムでpHを5.8に調整し温度90℃で1時間保持して、酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固形分濃度約16%まで濃縮した後、常法に従って脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約3.700gを含む糖液約6.2kgを得た。

【0142】得られた糖液を、オルガノ製イオン交換樹脂「アンバーライトCR-1310（Na型）」を充填したカラム（ゲル量約2251）に供し、カラム温度6

0℃で流速約45 l/hの条件でクロマト分離を行なった。溶出液の糖組成を実験1に記載のHPLC法でモニターし、環状四糖の純度が98%以上の画分を回収し、常法に従って脱塩、脱色、濾過、濃縮したところ、固形分約2,500 gを含む糖液約7.5 kgを得た。得られた糖液の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は約99.5%であった。

【0143】

【実験20】＜環状四糖の水溶液からの結晶化＞実験19の方法で得られた純度約98%以上の環状四糖画分をエバポレーターで固形物濃度約50%に濃縮した後、この濃縮糖液約5 kgを円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに回転させながら約20時間で温度を65℃から20℃まで降下させることにより晶析させたところ、白色の結晶状粉末が得られた。その顕微鏡写真の1例を図25に示す。続いて、遠心濾過器を用いて分蜜し結晶状物を湿重量として1,360 gを回収した。さらに、60℃で3時間乾燥して環状四糖結晶状粉末を1,170 g得た。得られた結晶粉末の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は99.9%以上と極めて高純度であった。

【0144】この環状四糖の結晶状粉末を粉末X線回折法で解析したところ、図26に示すように、主な回折角(2θ)として10.1°、15.2°、20.3°および25.5°を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分は13.0%であることがわかり、環状四糖1分子当たり5乃至6分子の水を含む結晶であることが判明した。

【0145】さらに、この環状四糖の結晶粉末を熱重量測定したところ、図27に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度150℃までの上昇で4乃至5分子の水に相当する重量減少が認められ、続いて、温度250℃付近で1分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度280℃付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖5乃至6含水結晶は、常圧において、温度を150℃まで上昇させることにより結晶分子当たり4乃至5分子の水が離脱して1分子の水を含む結晶になり、さらに温度250℃までに1分子の水が結晶から離脱して無水結晶になることが判明した。

【0146】

【実験21】＜環状四糖1含水結晶への変換＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶粉末をガラス容器に入れ、予め温度140℃に保温したオイルバス中にそのガラス容器を30分間保持した。得られた環状四糖粉末を粉末X線回折法で解析したところ、熱処理前の5乃至6含水結晶の粉末X線回折とは全く異なり、図28に示すように、主な回折角(2θ)として、8.3

°、16.6°、17.0°および18.2°を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分が約2.7%であることがわかり、環状四糖1分子当たり1分子の水を含むことが判明した。さらに、この結晶粉末を熱重量測定したところ、図29に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度270℃付近で1分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度290℃付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖結晶状物は1含水結晶であることが判明した。

【0147】

【実験22】＜無水結晶への変換＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶粉末を温度40℃乃至120℃でそれぞれ16時間真空乾燥した。得られた環状四糖粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、真空乾燥温度40℃の場合は水分が約4.2%であり、真空乾燥温度120℃の場合は水分が約0.2%で、実質的に無水であることが判明した。これら真空乾燥した環状四糖粉末を粉末X線回折法で解析したところ、真空乾燥前の5乃至6含水結晶の粉末X線回折および1含水結晶のものとは全く異なり、図30(真空乾燥温度40℃)、図31(真空乾燥温度120℃)に示すように、主な回折角(2θ)として、10.8°、14.7°、15.0°、15.7°および21.5°を特徴とする回折スペクトルが得られた。両回折スペクトル間でのピーク強度の強弱は認められるものの、基本的にピークの回折角度は同一で、結晶学的に同一無水結晶と推察された。また、回折スペクトルのベースラインは山状を呈し、真空乾燥前の環状四糖5乃至6含水結晶のものおよび1含水結晶のものと比べ結晶化度が低下しており、非結晶状態(アモルファス)の環状四糖が存在していることが判明した。このことから、真空乾燥40℃の場合の水分を約4.2%含む環状四糖粉末は、その水分を含む環状四糖アモルファスと、環状四糖無水結晶とが混在する粉末と推察された。以上のことから、環状四糖5乃至6含水結晶粉末を真空乾燥することにより、5乃至6含水結晶は水分子を失い、非結晶状態のアモルファスと無水結晶に変換することがわかった。なお、水分0.2%の無水環状四糖粉末について、実験20と同様に熱重量分析したところ、図32に示すように、温度270℃付近から環状四糖の熱分解と考えられる重量減少のみが観察された。

【0148】

【実験23】＜環状四糖の水に対する飽和濃度＞温度10乃至90℃での水に対する環状四糖の飽和濃度を調べるため、密栓付きガラス製容器に水10 mlを入れ、それに実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を、各温度で完全に溶解する量以上の量を加えた後、

ガラス容器を密封し、飽和に達するまで温度10乃至90℃で保温しながら2日間攪拌した。それぞれの温度の環状四糖飽和溶液を精密濾過して溶けていない環状四糖を除いた後、その濾液の水分を乾燥減量法で調べ、各温*

*度での飽和濃度を求めた。結果を表23に示す。

【0149】

【表23】

温度 (℃)	飽和濃度 (%)
10	30.3
30	34.2
50	42.6
70	53.0
90	70.5

【0150】

【実験24】＜熱安定性＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を水に溶解し濃度10w/v%の環状四糖水溶液を調製し、その溶液8mlをガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で30乃至90分20間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、H※

※PLC法による純度測定を行った。着色度は、480nmにおける1cmセルでの吸光度により評価した。結果は表24に示す。

【0151】

【表24】

加熱時間 (分)	着色度 (A480nm)	純度 (%)
0	0.00	100
30	0.00	100
60	0.00	100
90	0.00	100

【0152】表24の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は120℃の高温加熱でも着色はなく、糖組成の純度の低下もなく、環状四糖は熱に対して安定な糖質であることが判明した。

【0153】

【実験25】＜pH安定性＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を各種の緩衝液（20mM）に溶解し、環状四糖を濃度4w/v%、pHを2乃至1★

★0に調整した環状四糖溶液を調製した。それぞれの溶液8mlをガラス製試験管に採り、密封した後、100℃で24時間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、HPLC法による純度測定を行った。着色度は、480nmにおける1cmセルでの吸光度により評価した。結果は表25に示す。

【0154】

【表25】

pH (緩衝液の種類)	着色度 (A480nm)	純度 (%)
2.0 (酢酸)	0.00	93
3.0 (酢酸)	0.00	100
4.0 (酢酸)	0.00	100
5.0 (酢酸)	0.00	100
6.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
7.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
8.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
9.0 (アンモニウム)	0.00	100
10.0 (アンモニウム)	0.00	100

【0155】表25の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は120℃の高温で24時間加熱しても、pH

2乃至10の広範囲で着色はなく、pH2において糖組成の純度は僅かに低下するものの、pH3乃至10の範

開では全く糖組成の純度は低下せず、環状四糖は広い pH 範囲、換言すれば、pH 3 乃至 5 の酸性側、pH 6 乃至 8 の中性側、pH 9 乃至 10 のアルカリ側で煮沸しても極めて安定な糖質であることが判明した。

【0156】

【実験 26】＜アミノカルボニル反応＞実験 20 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し、さらに、それに市販試薬特級のグリシンとリン酸緩衝液を加え、50 mM リン酸緩衝液で pH 7.0 に調整した 1 w/v % グリシンを含む 10 w/v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 ml をガラス製試験管に採り、密封した後、100℃で 30 乃至 90 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。着色度は、480 nm における 1 cm セルでの吸光度により評価した。結果を表 26 に示す。

【0157】

【表 26】

加熱時間 (分)	着色度 (A _{480nm})
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

20

*

加熱時間 (分)	着色度 (A _{480nm})
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

【0161】表 27 の結果から明らかなように、環状四糖は、ポリペプトン共存下で加熱して、ポリペプトンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

【0162】

【実験 28】＜包接作用＞実験 20 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱イオン水に溶かし、20 % 水溶液を調製した。その水溶液 100 g 当たり、メタノールは 2 g、エタノールは 3 g、酢酸は 4.6 g を加えて包接を行なった。その後、それぞれを濾過し濾液を凍結乾燥し、未包接物を除去した。対照として、包接能を※

包 接 物	包接量 (mg/g 凍結乾燥粉末)	
	環状四糖	イソエリート P (対照)
メ タ ノ ー ル	6.71	2.92
エ タ ノ ー ル	17.26	8.92
酢 酸	67.74	30.57

* 【0158】表 26 の結果から明らかなように、環状四糖は、グリシン共存下で加熱しても着色はなく、グリシンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応（メイラード反応とも言う）を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

【0159】

【実験 27】＜アミノカルボニル反応＞実験 20 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶と市販ポリペプトン（日本製薬製）とを脱イオン水に溶かし、5 w/v % ポリペプトンを含む 10 w/v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 ml をガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で 30 乃至 90 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。同時に、ポリペプトンのみを含む溶液をブランクとして同様に加熱した。着色度は、480 nm における 1 cm セルでの吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値に基づいて評価した。結果を表 27 に示す。

【0160】

【表 27】

※有することが知られている分枝シクロデキストリン（商品名『イソエリート P』、マルハ株式会社販売）を用いて同様に行なった。

【0163】凍結乾燥粉末中の包接物量を測定するために、それぞれの凍結乾燥粉末 1 g を 5 ml の水に溶かし、それに 5 ml のジエチルエーテルを加えて抽出を行ない、再度、抽出を繰り返した後、ジエチルエーテル中の抽出物をガスクロマトグラフィー法で定量した。結果を表 28 に示す。

【0164】

【表 28】

【0165】表28の結果から明らかなように、環状四糖は包接能を有しており、その包接能は、分枝サイクロデキストリンと比べ、重量当たり約2倍も高いことが判明した。

【0166】

【実験29】＜甘味度＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を脱イオン水に溶かし、固形物濃度10%水溶液を調製し、この環状四糖10%水溶液を基準とし、蔗糖（市販グラニュー糖）の濃度を変え、パネラー5名で官能試験を行なった。その結果、環状四糖の甘味度は、蔗糖の約20%であった。

消化酵素	消化酵素による分解率(%)	
	環状四糖	マルチトール(対照)
唾液アミラーゼ	0.0	0.0
合成胃液	0.0	0.0
膵液アミラーゼ	0.0	0.0
小腸粘膜酵素	0.74	4.0

【0169】表29の結果から明らかなように、環状四糖は、唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼで全く消化されず、小腸粘膜酵素によって僅かに消化されたが、その程度は0.74%と低値であり、対照の難消化性糖質マルチトールの値と比較すると1/5以下であり、環状四糖が極めて消化されにくい糖質であることが判明した。

【0170】

【実験31】＜醗酵性試験＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至含水結晶を用いて、『ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー (Journal of Nutritional Science and Vitaminology)』、第37巻、第529乃至544頁(1991年)に記載のOku等の方法に準じて、ラット盲腸内容物による環状四糖の発酵性を調べた。盲腸内容物は、ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下で屠殺し嫌氣的に採取し、4倍量の0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁したものを用いた。環状四糖は盲腸内容物重量当たり約7%を添加し、添加直後および12時間後に残存する環状四糖量はガスクロマトグラフィー法で定量した。

* 【0167】

【実験30】＜消化性試験＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を用いて、『日本栄養食糧学会誌』、第43巻、第23乃至29頁(1990年)に記載の岡田等の方法に準じて、試験管内での唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼ、小腸粘膜酵素による環状四糖の消化性を調べた。対照として、難消化性糖質として知られているマルチトールを用いて行なった。結果を表29に示す。

【0168】

* 【表29】

その結果、添加直後の環状四糖濃度は盲腸内容物g当たり68.0mg、12時間後の環状四糖濃度は盲腸内容物g当たり63.0mgであり、93%が醗酵されず残存していることがわかり、環状四糖は極めて醗酵されにくい糖質であることが判明した。

【0171】

【実験32】＜資化性試験＞実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を用いて、『腸内フローラと食物因子』、光岡知足編、学会出版センター(1984年)に記載の方法に準じて、各種腸内細菌の資化性を調べた。即ち、予め培養しておいた新鮮な菌を、環状四糖を0.5%添加したPYF培地5mlに約 10^7 CFU接種し、嫌気条件下で37℃、4日間培養した。対照として、資化されやすい糖質グルコースを用いて行なった。資化性の判定は、培養後の培養液のpHが、6.0以上の場合、資化されない(－)とし、6.0未満の場合、資化される(＋)とした。さらに、培養液中に残存する糖質をアンスロン法で測定し糖質の減少量を調べ、資化性の判定を確認した。結果を表30に示す。

【0172】

【表30】

腸 内 細 菌 株	資 化 性	
	環 状 四 糖	グルコース (対照)
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	—	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	—	+
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	—	+
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	—	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	—	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	—	+

【0173】表30の結果から明らかなように、環状四糖は、試験した腸内細菌株のいずれにも資化されなく、対照のグルコースはいずれにも資化されることがわかり、環状四糖が腸内細菌に極めて資化されにくい糖質であることが判明した。

【0174】

【実験33】＜急性毒性試験＞マウスを使用して、実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を経口投与して急性毒性試験を行なった。その結果、環状四糖は低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD50値は、50g/kgマウス体重以上であった。

【0175】以上の実験30乃至33の結果から、環状四糖は、経口摂取しても、消化、吸収されにくく、無カロリー乃至低カロリーの可食素材として、ダイエット甘味料、高甘味度甘味料の賦形剤、ダイエット飲食物の増粘剤、増量剤、賦形剤、更には、食物繊維、脂肪代替食品材料などとしての利用が期待できる。

【0176】以下、本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物の製造方法を実施例Aで、環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物を含有させた組成物を実施例Bで示す。

【0177】

【実施例A-1】パチルス グロビスポルス C9 (FERM BP-7143) を実験3の方法に準じて、ファーマンターで48時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約18lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を8.8単位/mlと α -イソマルトシル転

移酵素を26.7単位/mlとを含む濃縮酵素液約1lを回収した。

【0178】馬鈴薯澱粉乳を濃度約2%澱粉乳とし、これに最終濃度1mMとなるように塩化カルシウムを加え、pH6.0に調整し、95℃に約20分間加熱して糊化を行い、次いで約35℃に冷却し、これに前記方法で調製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当たり0.25mlの割合になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過し、以後、常法にしたがって精製（脱色、脱塩）し、濃縮して濃度50%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。本シラップをオートクレーブに入れ、ラネーニッケル6%を添加し、攪拌しながら温度を90乃至120℃に上げ、水素圧を20乃至120kg/cm²に上げて水素添加を完了させた後、ラネーニッケルを除去し、次いで、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して、濃度70%のシラップを原料澱粉固形物当たり約80%の収率で得た。

【0179】本シラップは、環状四糖とともに糖アルコールを含有するDEO.5未満の糖質混合物で、固形物当たり、環状四糖62.1%、ソルビトール0.7%、イソマルチトール1.4%、マルチトール11.1%およびその他の糖アルコールを24.7%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、低カロリー甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0180】

【実施例 A-2】馬鈴薯澱粉を濃度約 6 %澱粉乳とし、これに濃度 0.1 %となるように炭酸カルシウムを加え、pH 6.0 に調整し、これに α -アミラーゼ（商品名『ターマミール 60 L』、ノボ社製）を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.2 %になるように加え、95℃で 10 分間反応させ、次いで 120℃で 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに実施例 A-1 の方法で調製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.25 ml の割合になるように加え、pH 6.0、温度 35℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90 %で得た。本シラップを実施例 A-1 の方法に準じて、水素添加し、精製し、濃縮し、以後、常法にしたがって精製（脱色、脱塩）し、濃縮して濃度 70 %のシラップを原料澱粉固形物当たり約 80 %の収率で得た。本シラップは、環状四糖とともに糖アルコールを含有する DE 0.5 未満の糖質混合物で、固形物当たり、環状四糖 60.1 %、ソルビトール 0.9 %、イソマルチトール 1.5 %、マルチトール 1.3 %およびその他の糖アルコールを 26.2 %含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、低カロリー甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0181】

【実施例 A-3】バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を実験 6 の方法に準じて、ファーマンターで 48 時間培養した。培養後、SF 膜を用いて除菌濾過し、約 18 l の培養濾液を回収し、更に、その濾液を UF 膜濃縮し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を 9.0 単位/ml と α -イソマルトシル転移酵素を 30.2 単位/ml とを含む濃縮酵素液約 1 l を回収した。タピオカ澱粉を濃度約 25 %澱粉乳とし、これに α -アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.2 %加え、85乃至 90℃で約 20 分間反応させ、次いで 120℃で 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに上記の方法で調製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.25 ml の割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉固形物 1 グラム当たり 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 5

0℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過し、以後、常法にしたがって精製（脱色、脱塩）し、濃縮して濃度 50 %の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90 %で得た。本シラップを実施例 A-1 の方法に準じて、水素添加し、精製し、濃縮して、濃度 77 %のシラップとし、これを助晶缶にとり、種晶として環状四糖 5乃至 6 含水結晶及びソルビトール含水結晶をそれぞれ約 2 %ずつ加えて徐冷し、マスキットとし、これを乾燥塔上のノズルより 150 kg/cm² の高圧にて噴霧した。これと同時に 85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より 45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10 時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、環状四糖 5乃至 6 含水結晶及びソルビトール含水結晶を含有する粉末を得た。本品は、環状四糖とともに糖アルコールを含有する DE 0.5 未満の糖質混合物で、固形物当たり（無水物換算）、環状四糖 58.1 %、ソルビトール 38.4 %及びその他の糖アルコールを 3.5 %含有しており、温和な甘味、保湿性、包接性を有し、低カロリー甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0182】

【実施例 A-4】とうもろこし澱粉を濃度約 20 %の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1 %加え、pH 6.5 に調整し、 α -アミラーゼ（商品名『ターマミール 60 L』、ノボ社製）を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.3 %加え、95℃で 15 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに実施例 A-3 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.25 ml の割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉固形物 1 グラム当たり 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更に

グルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃ に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過し、以後、常法にしたがって精製（脱色、脱塩）し、濃縮して濃度 50% の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90% で得た。本シラップを実施例 A-1 の方法に準じて、水素添加し、精製し濃縮して、濃度 85% のシラップとし、これを助品缶にとり、種品として、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を約 2% 加え、攪拌しつつ徐冷して助品し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で 2 日間放置し、晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎して環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を含有する粉末を得た。本品は、環状四糖とともに澱粉糖アルコールを含有する DEO. 5 未満の糖質混合物で、固形物当たり（無水物換算）、環状四糖 62.7%、ソルビトール 34.2% 及びその他の糖アルコールを 3.1% 含有しており、温和な甘味、保湿性、包接性を有し、低カロリー甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0183】

【実施例 B-1】＜甘味料＞実施例 A-3 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 1 重量部に、 α -グリコシルステビオシド、東洋精糖株式会社販売『 α G スイート』0.01 重量部及び L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、味の素株式会社販売『アスパルテム』0.01 重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有し、実質的に低カロリーである。本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0184】

【実施例 B-2】＜ハードキャンディー＞濃度 55% 蔗糖溶液 100 重量部に実施例 A-1 の方法で得た環状四糖とともに糖アルコールを含有するシラップ 30 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2% 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 1 重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出、変形も起こらない高品質のハードキャンディーである。また、本品は、低カロリー、低う蝕性のハードキャンディーとしても好適である。

【0185】

【実施例 B-3】＜チョコレート＞カカオペースト 40 重量部、カカオバター 10 重量部、蔗糖 30 重量部、実施例 A-4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 20 重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて 50℃ で 2 昼夜練り上げた。この間に、レシチン 0.5 重量部を加え十分に混和分散させた。次いで、温度調節器で 31℃ に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、10℃ の冷却トンネルを 20 分間くぐらせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

【0186】

【実施例 B-4】＜チューインガム＞ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖 4 重量部及び実施例 A-3 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 3 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。また、本品は、低カロリー、低う蝕性のチューインガムとしても好適である。

【0187】

【実施例 B-5】＜加糖練乳＞原乳 100 重量部に実施例 A-2 の方法で得た環状四糖とともに糖アルコールを含有するシラップ 3 重量部及び蔗糖 1 重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度 70% に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0188】

【実施例 B-6】＜乳酸菌飲料＞脱脂粉乳 17.5 重量部、実施例 A-3 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 80 重量部及び特開平 4-281795 号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末 50 重量部を水 1,200 重量部に溶解し、65℃ で 30 分間殺菌し、40℃ に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを 30 重量部接種し、37℃ で 8 時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好な低カロリー乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0189】

【実施例 B-7】＜粉末ジュース＞噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末 33 重量部に対して、実施例 A-4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 50 重量部、蔗糖 10

重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-2の方法で得た環状四糖とともに糖アルコールを含有するシラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約30%の低カロリー粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0190】

【実施例B-8】＜カスタードクリーム＞コーンスターチ100重量部、実施例A-1の方法で得た環状四糖とともに糖アルコールを含有するシラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部及び食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0191】

【実施例B-9】＜ういろの素＞米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、蔗糖40重量部、実施例A-3の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末80重量部及びプルラン4重量部を均一に混合してういろの素を製造した。ういろの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろを製造した。本品は、照り、口当りも良好で、風味も良く、低カロリーである。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0192】

【実施例B-10】＜あん＞原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-2の方法で得た環状四糖とともに糖アルコールを含有するシラップ5重量部及び水4重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。

【0193】

【実施例B-11】＜パン＞小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-4の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末1重量部及び無機フード0.1重量

部を、常法にしたがって、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。本品は、色相、すだちとともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0194】

【実施例B-12】＜ハム＞豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部及び硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-3の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末40重量部及び香辛料からなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0195】

【実施例B-13】＜粉末ペプチド＞濃度40%食品用大豆ペプチド溶液、不二製油株式会社製『ハイニュートS』1重量部に、実施例A-4の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0196】

【実施例B-14】＜化粧用クリーム＞モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-3の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末2重量部、 α -グリコシルルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0197】

【実施例B-15】＜固体制剤＞ヒト天然型インターフェロナー α 標品（株式会社林原生物化学研究所製）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロナー α 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロナー α を吸着させ、安定剤であるウシ血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロナー α を実施例A-4の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末を5%含有する生理食塩水を用

いて溶出した。本液を精密濾過し、約 20 倍量の株式会社林原商事販売無水結晶マルトース粉末『ファイントース』に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1 錠（約 200 mg）当たりヒト天然型インターフェロン- α を約 150 単位含有する錠剤を得た。本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人 1 乃至 10 錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0198】

【実施例 B-16】<糖衣錠>重量 150 mg の素錠を芯剤とし、これに実施例 A-3 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 40 重量部、プルラン（平均分子量 20 万）2 重量部、水 30 重量部、タルク 25 重量部及び酸化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約 230 mg になるまで糖衣し、次いで、同じ環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 65 重量部、プルラン 1 重量部及び水 34 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢の在る外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0199】

【実施例 B-17】<練歯磨>第 2 リン酸カルシウム 45.0 重量部、プルラン 2.95 重量部、ラウリル硫酸ナトリウム 1.5 重量部、グリセリン 20.0 重量部、ポリオキシエチレンソルビタンラウレート 0.5 重量部、防腐剤 0.05 重量部、実施例 A-3 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 12.0 重量部、マルチトール 5.0 重量部及び水 13.0 重量部を常法にしたがって混合し、練歯磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

【0200】

【実施例 B-18】<流動食用固体製剤>実施例 A-4 の方法で製造した環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 100 重量部、マルトース 1 含水結晶 200 重量部、 α 、 α -トレハロース 2 含水結晶 200 重量部、粉末卵黄 270 重量部、脱脂粉乳 209 重量部、塩化ナトリウム 4.4 重量部、塩化カリウム 1.8 重量部、硫酸マグネシウム 4 重量部、チアミン 0.01 重量部、アスコルビン酸ナトリウム 0.1 重量部、ビタミン E アセテート 0.6 重量部及びニコチン酸アミド 0.04 重量部からなる配合物を調製し、この配合物 25 グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1 袋分を約

150 乃至 300 ml の水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体への栄養補給用に有利に利用できる。

【0201】

【実施例 B-19】<外傷治療用膏薬>実施例 A-3 の方法で製造した環状四糖 5 乃至 6 含水結晶とともにソルビトール無水結晶を含有する粉末 200 重量部及びマルトース 300 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 50 重量部を加え混合し、更に 10 w/v % プルラン水溶液 200 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用によって治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

【0202】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の環状四糖とともに澱粉糖アルコールを含有してなる糖質混合物は、実質的に非還元性で安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。したがって、本発明の糖質混合物は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。また、本発明の糖質混合物の製造に用いる原料用還元性糖質としては、パノースなどの α -イソマルトシルグルコ糖質含有溶液に α -イソマルトシル転移酵素を作用させるか、又は、澱粉を液化した溶液に、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させることにより、環状四糖とともに還元性糖質を含有する糖質を得て、これを水素添加し、環状四糖を単離することなく、還元性糖質を対応する糖アルコールに変換させて還元性を低減させ、次いで精製することにより、比較的低分子、低粘度で取扱い容易な DEO.5 未満の実質的に非還元性糖質混合物を得る。このようにして得ることのできる本発明の糖質混合物は、例えば、低カロリー甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして広範囲な用途に利用できる。

【0203】本発明の環状四糖とともに糖アルコールを含有してなる糖質混合物とその製造方法の確立並びにその用途の提供は、安価で無限の資源である澱粉を原料として製造される、従来望むべくして容易に得られなかった環状四糖とともに還元性糖質を含有する糖質から工業的に大量かつ安価に提供できる全く新しい道を拓くこととなり、本発明の工業実施を極めて容易にする。したがって、本発明が与える影響は、食品、化粧品、医薬品業界は言うに及ばず、農水畜産業、化学工業にも及びこれら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【0204】

【配列表】SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo

<120> Saccharide Composition, Preparation And Uses
Thereof

<130> 10088801

<160>10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 1

Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 2

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 3

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 4

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 5

Asp Ala Ser Ala Asn Val Thr Thr

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 6

Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 7

Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

10 <400> 8

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 9

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser

1 5

20 <210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 10

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser

1 5

【0205】

【図面の簡単な説明】

30 【図1】 α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた糖質を高速液体クロマトグラフィーにかけたときの溶出パターンを示す図である。

【図2】 α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR スペクトル) を示す図である。

【図3】 α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR スペクトル) を示す図である。

40 【図4】 環状四糖の構造が、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow) であることを示す図である。

【図5】 バチルス グロビスポルス C9由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】 バチルス グロビスポルス C9由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

50 【図7】 バチルス グロビスポルス C9由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図で

ある。

【図 8】バチルス グロビスポルス C 9 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 9】バチルス グロビスポルス C 9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 10】バチルス グロビスポルス C 9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 11】バチルス グロビスポルス C 9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

【図 12】バチルス グロビスポルス C 9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 13】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 14】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 15】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図 16】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 17】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 18】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 19】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

【図 20】バチルス グロビスポルス C 11 由来の α -*

* イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 21】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトトリオースの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【図 22】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトテトラオースの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【図 23】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトトリオースの ^{13}C -NMR スペクトルを示す図である。

【図 24】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトテトラオースの ^{13}C -NMR スペクトルを示す図である。

【図 25】5 乃至 6 含水結晶環状四糖の顕微鏡写真をディスプレイに表示した中間調画像を示す図である。

【図 26】5 乃至 6 含水結晶環状四糖状粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 27】5 乃至 6 含水結晶環状四糖状粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

【図 28】本発明の 1 含水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

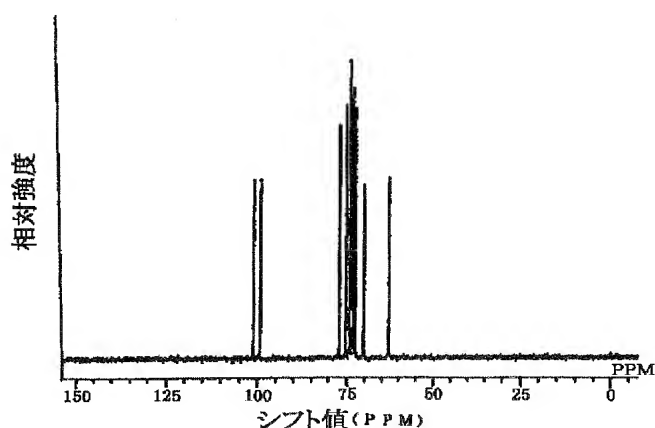
【図 29】本発明の 1 含水結晶環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

【図 30】5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末を 40℃ で真空乾燥して得られる無水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

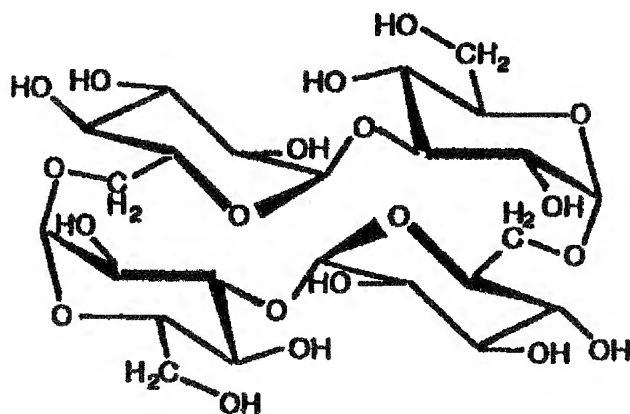
【図 31】5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末を 120℃ で真空乾燥して得られる無水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 32】本発明の無水結晶環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

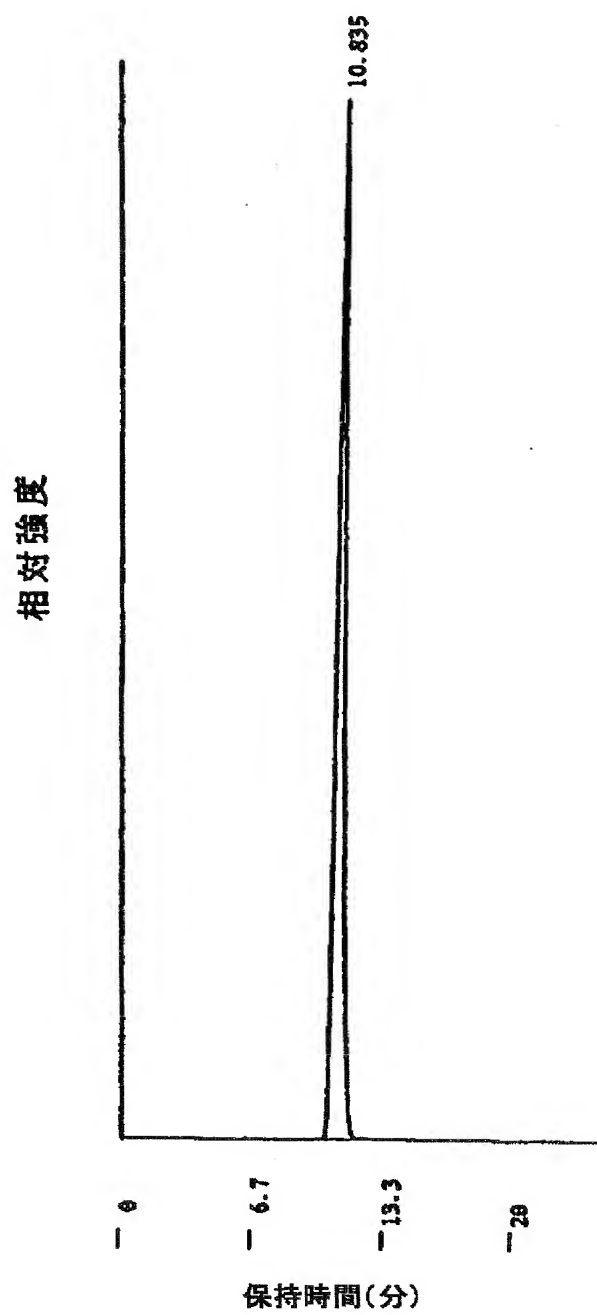
【図 3】



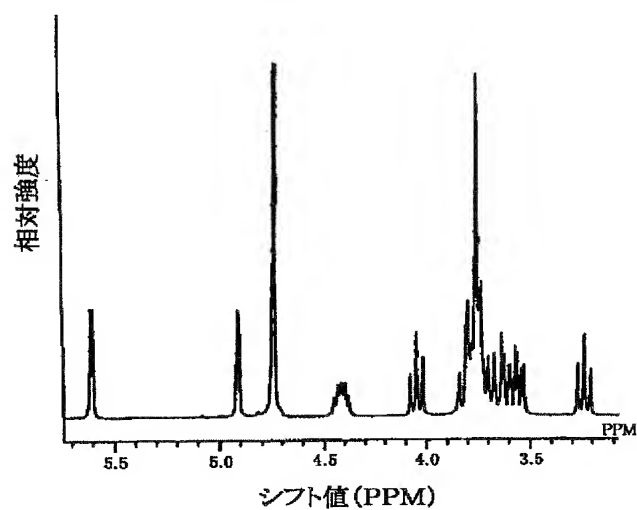
【図 4】



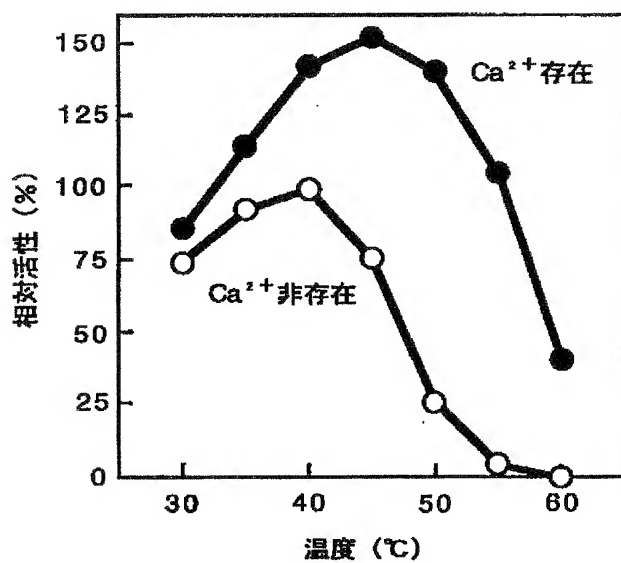
【図1】



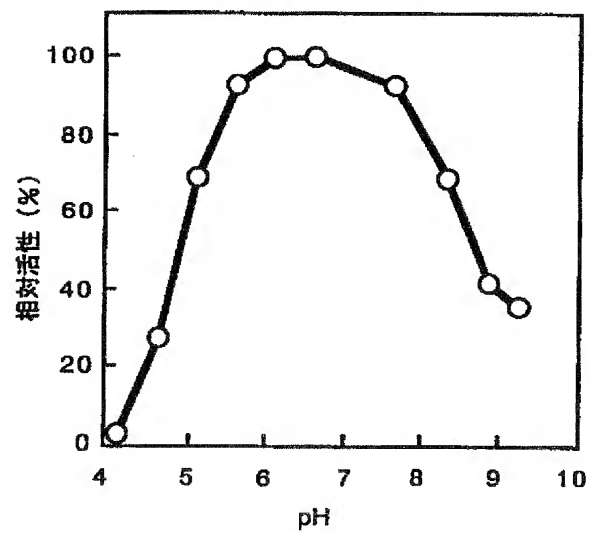
【図2】



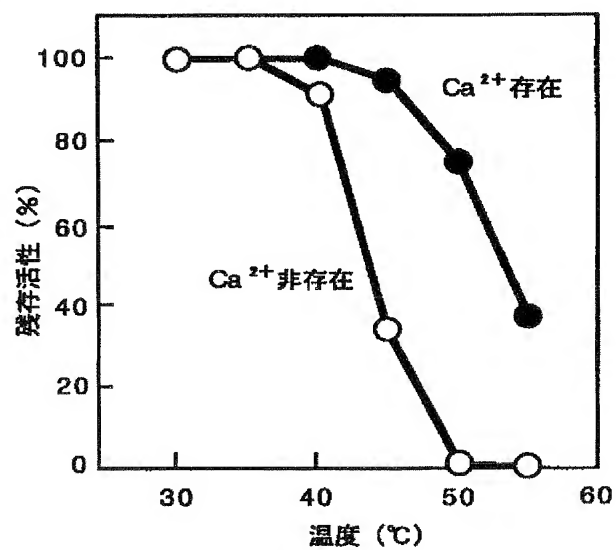
【図5】



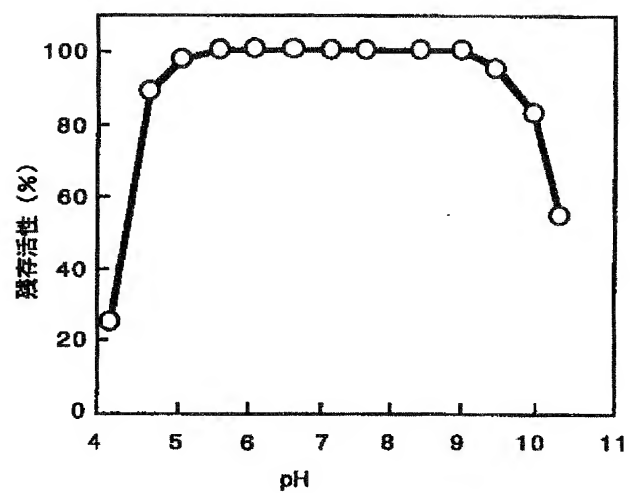
【図6】



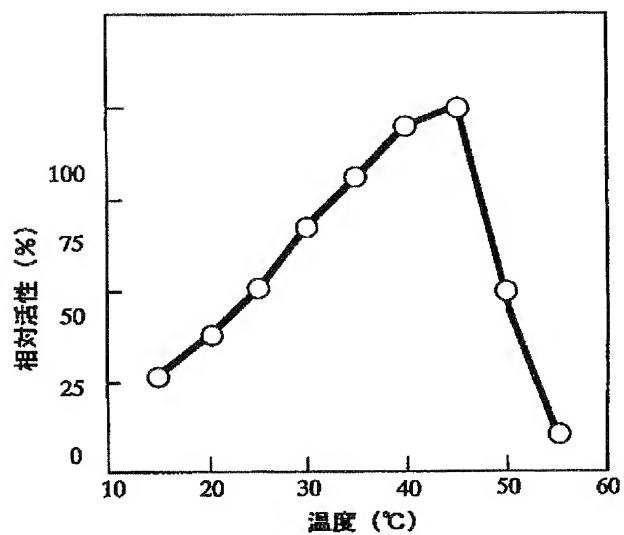
【図7】



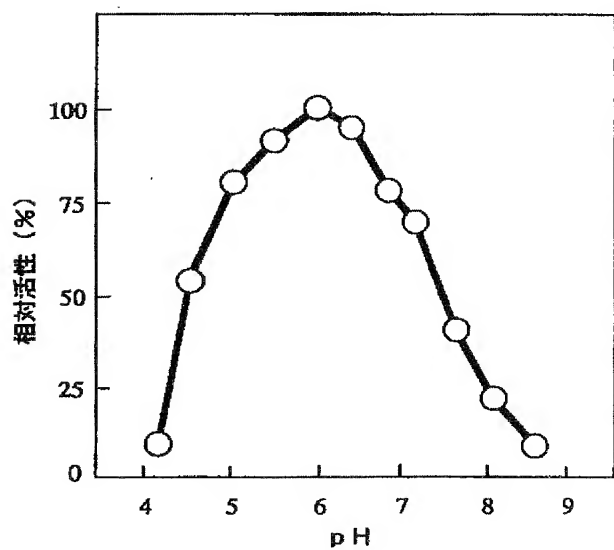
【図8】



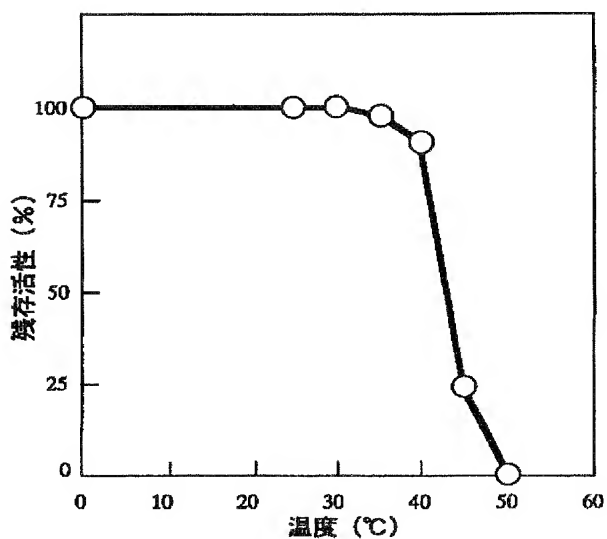
【図9】



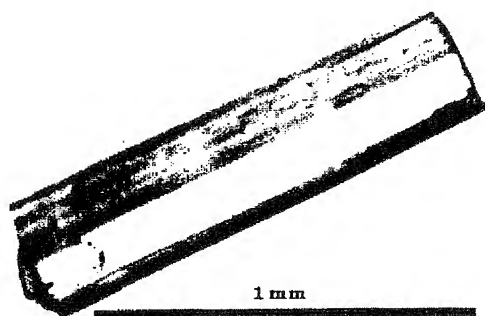
【図10】



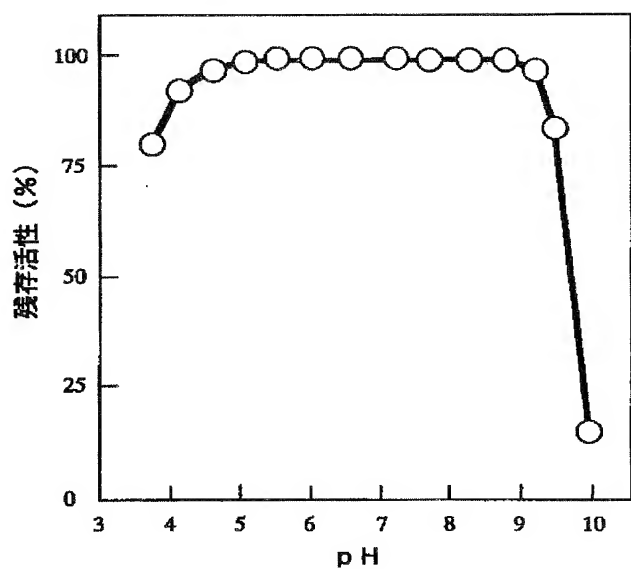
【図11】



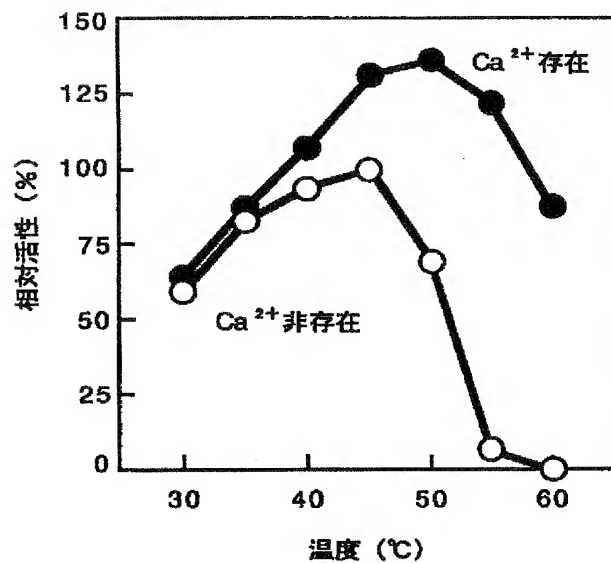
【図25】



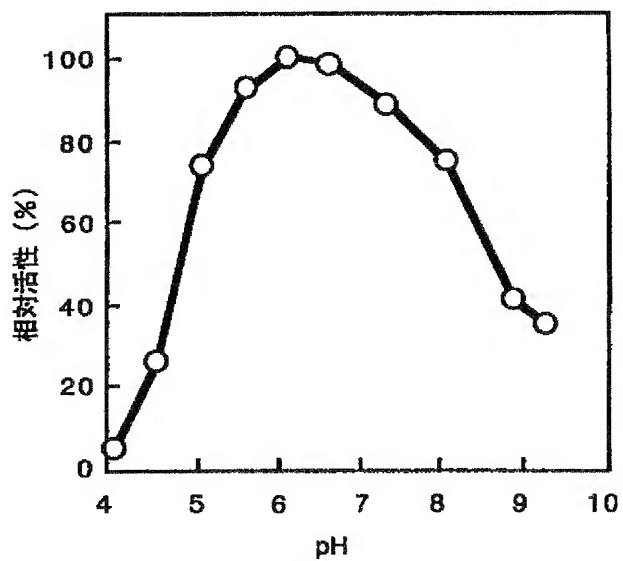
【図12】



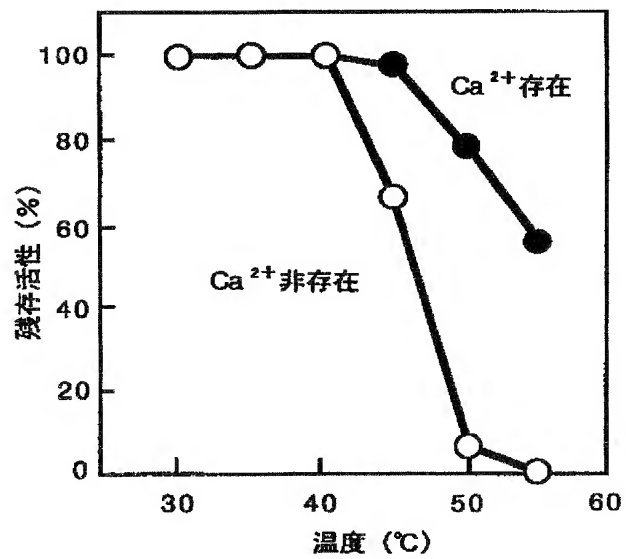
【図13】



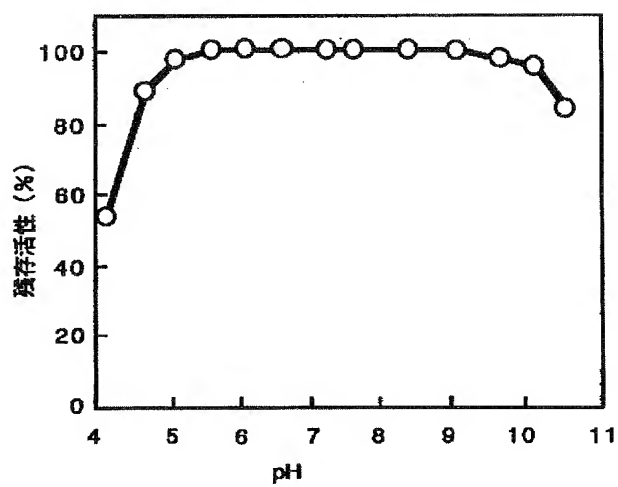
【図14】



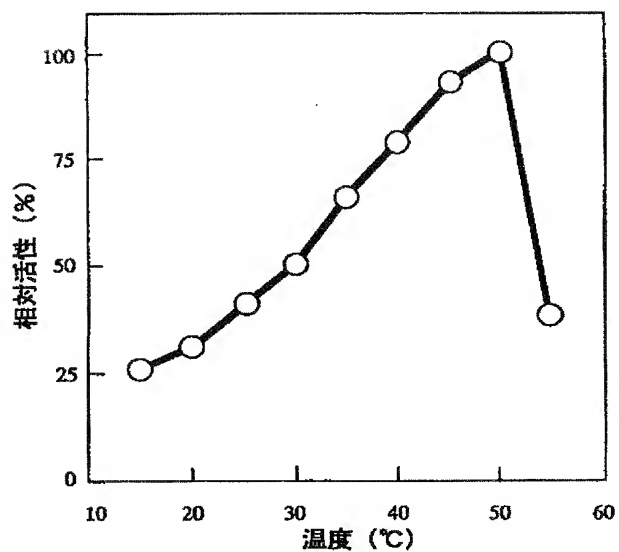
【図15】



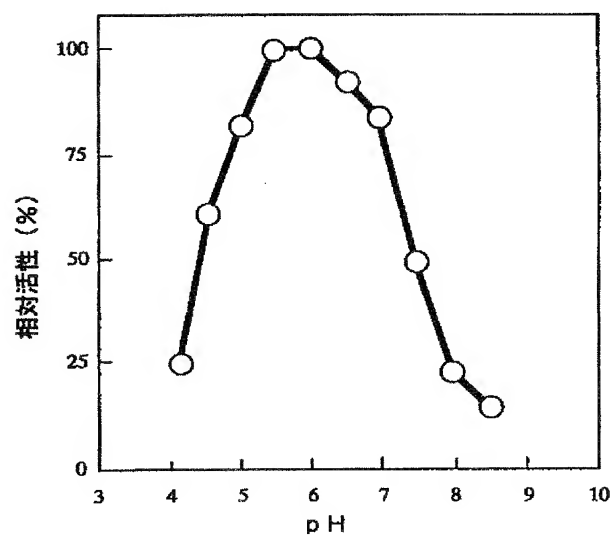
【図16】



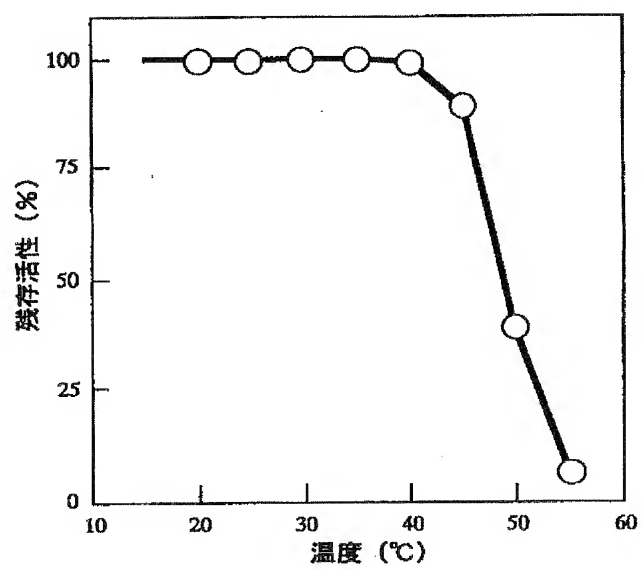
【図17】



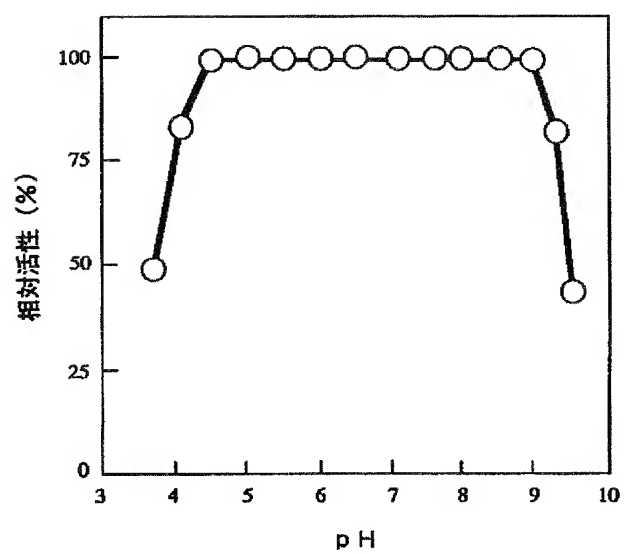
【図18】



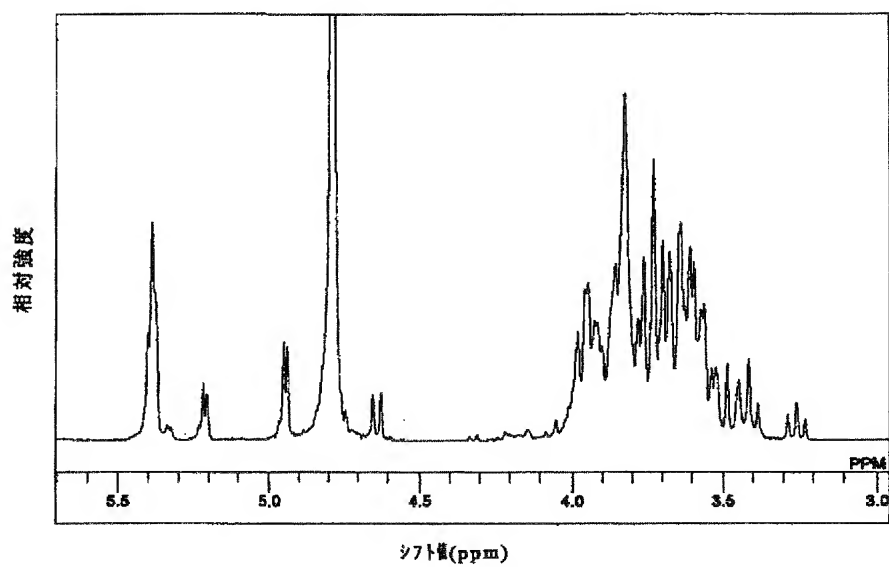
【図19】



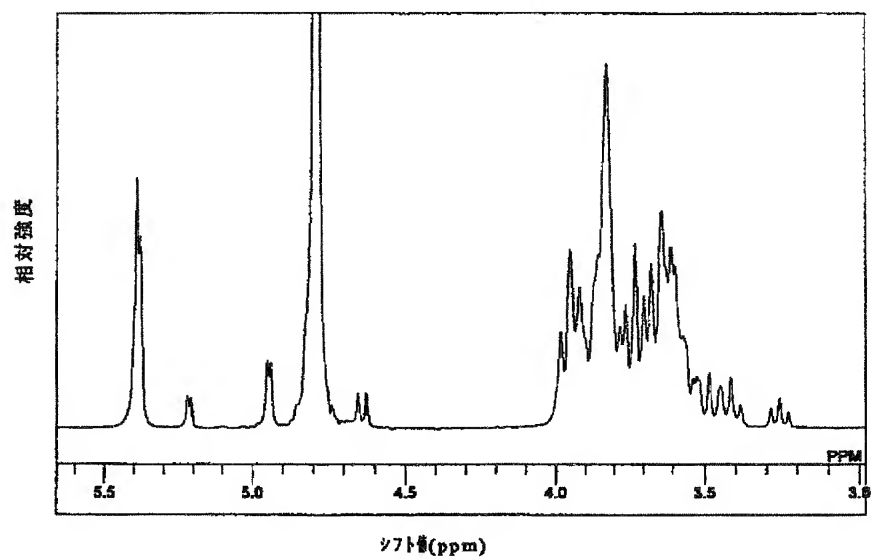
【図20】



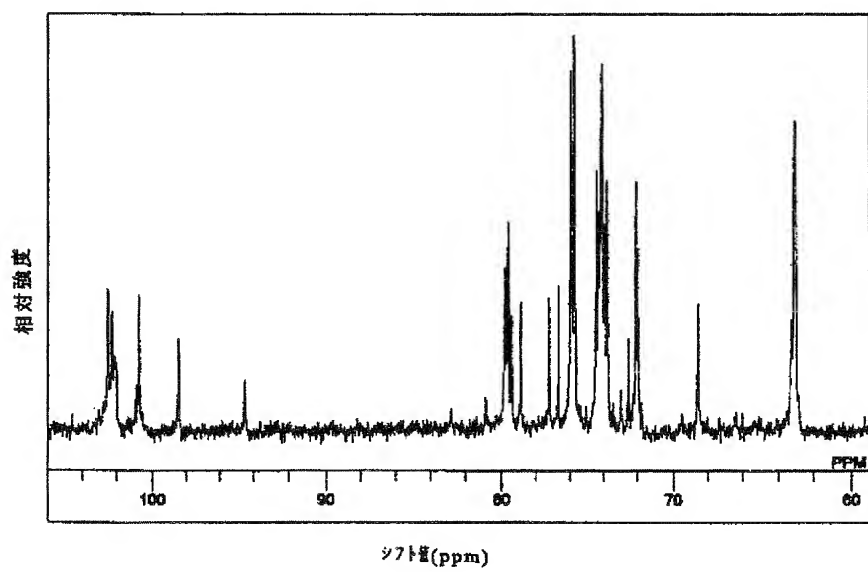
【図21】



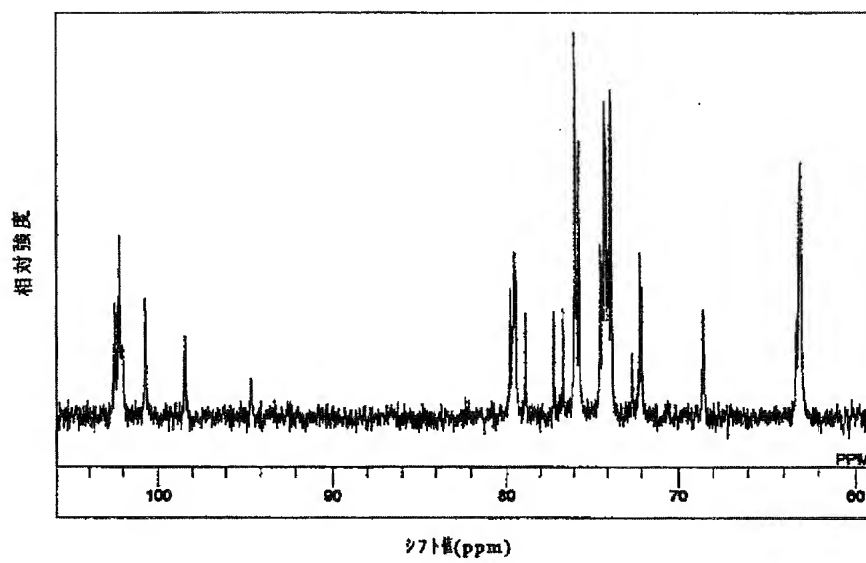
【図22】



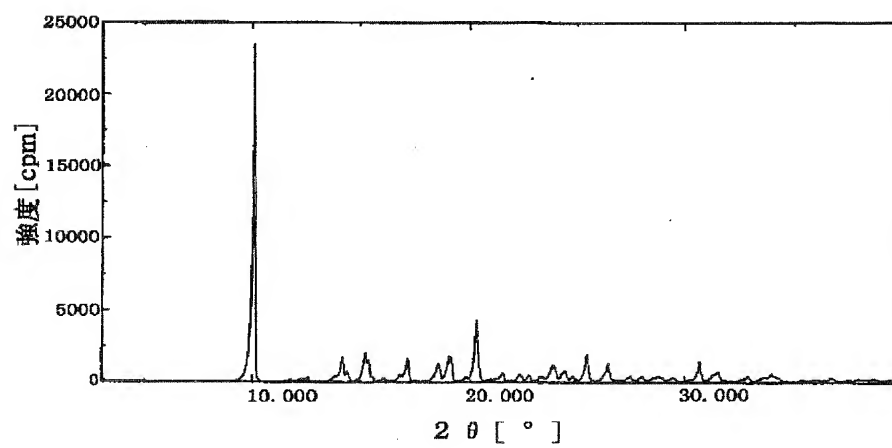
【図23】



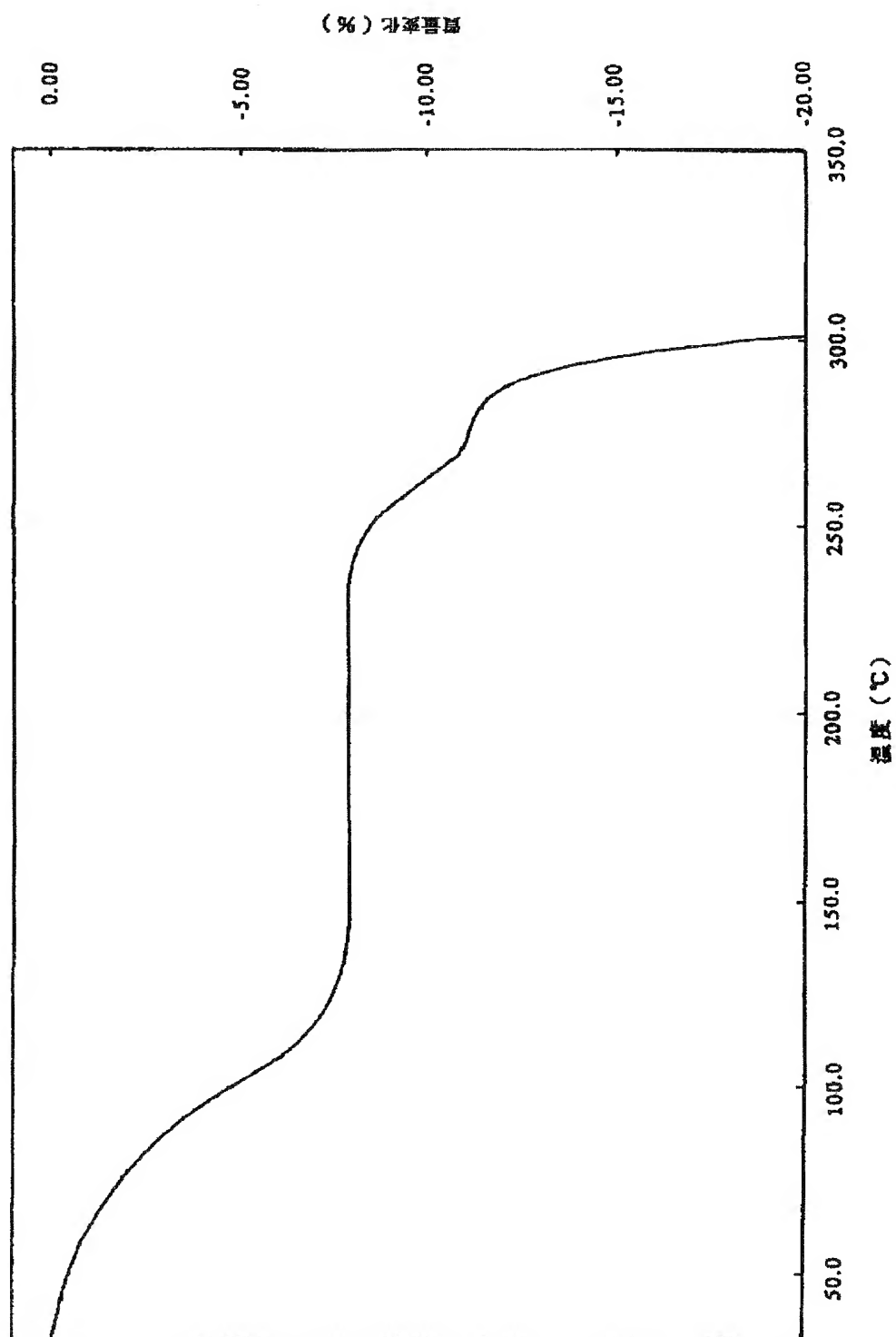
【図24】



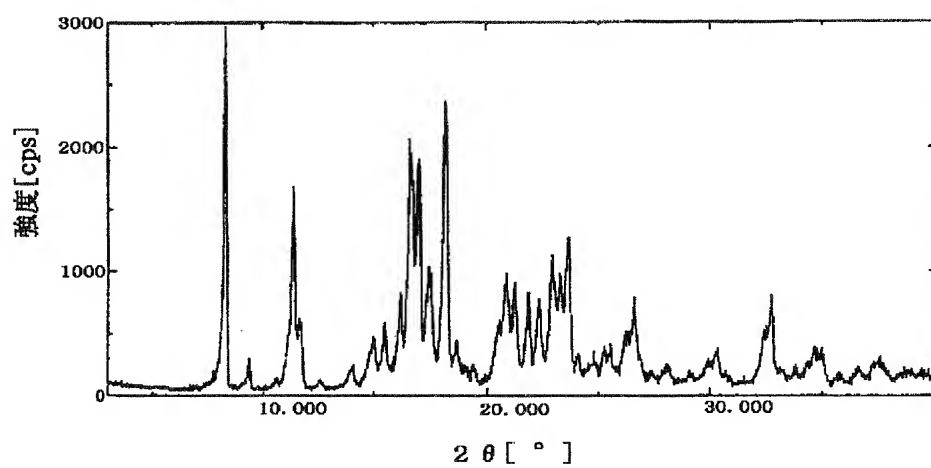
【図26】



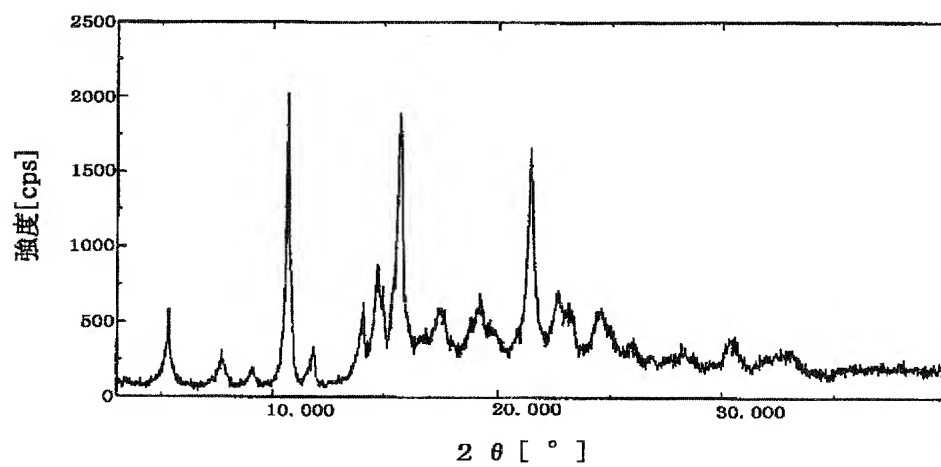
【図27】



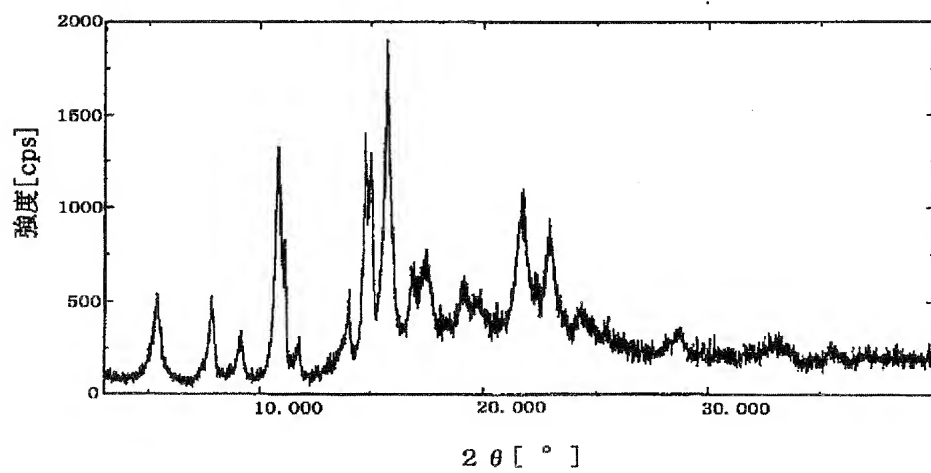
【図28】



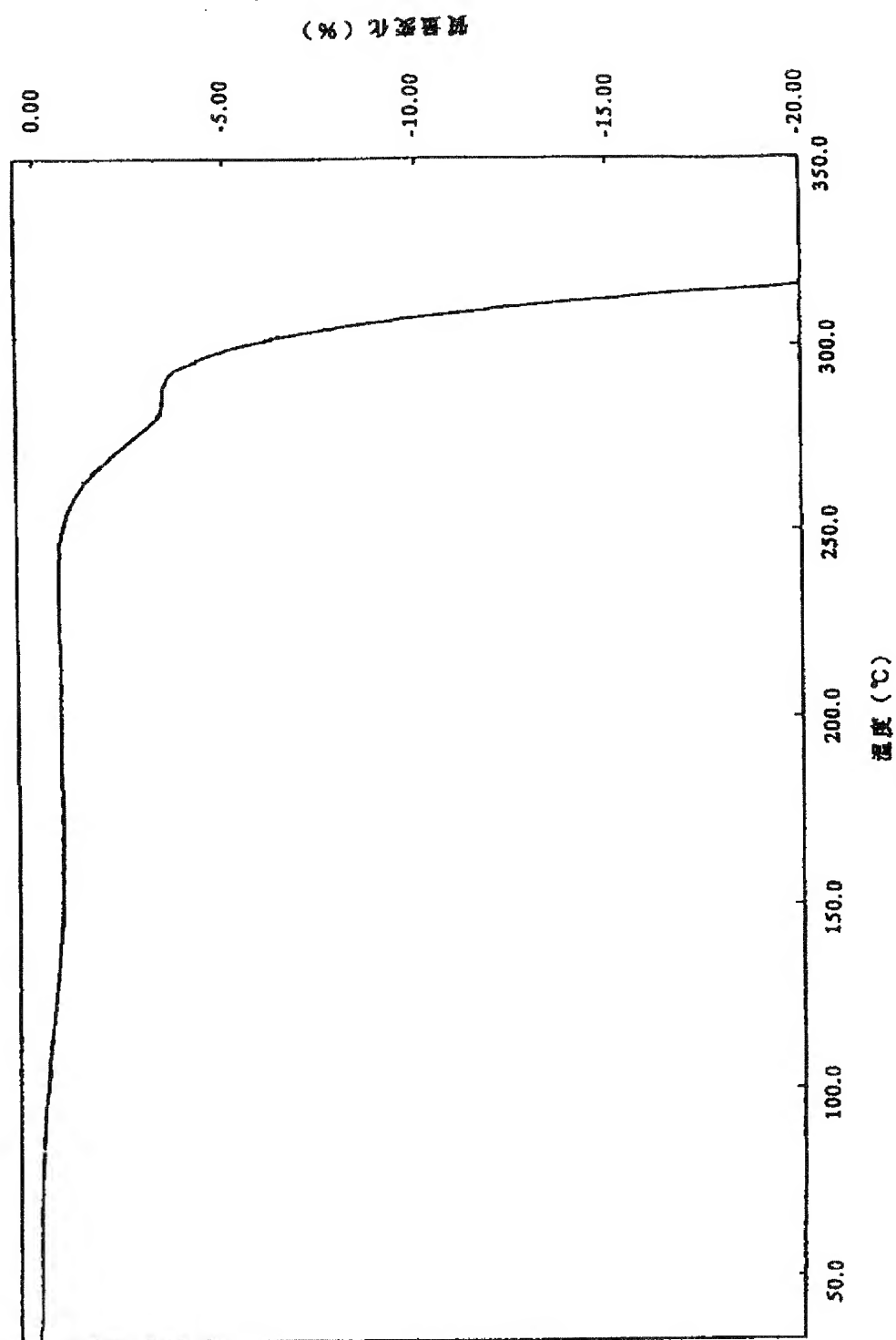
【図30】



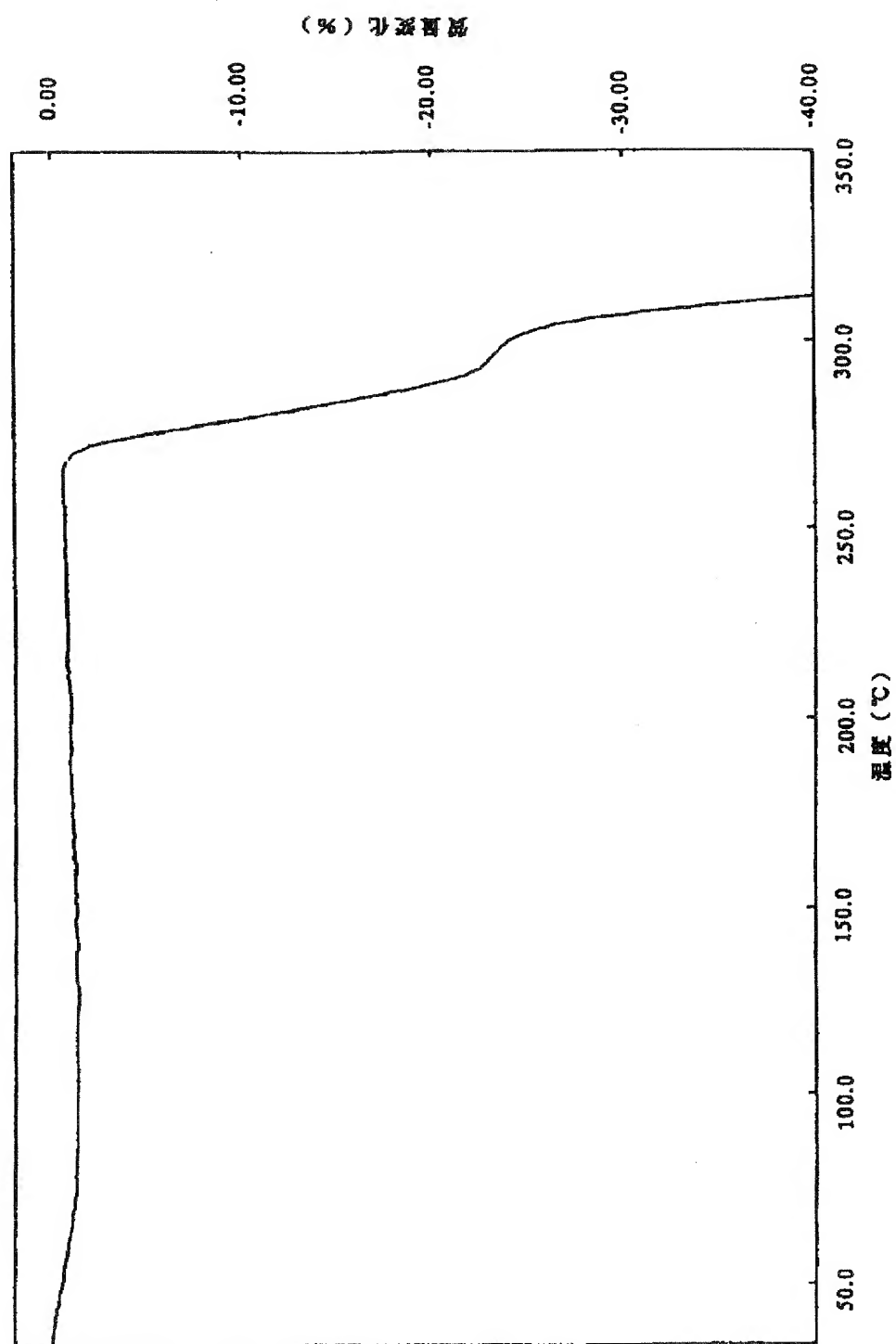
【図31】



【図29】



【図32】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード' (参考)		
A 2 3 L	1/236	A 2 3 L	1/236	B	4 C 0 5 7
	1/30		1/30	Z	4 C 0 7 6
	1/307		1/307		4 C 0 8 3
	2/52	A 6 1 K	7/00	F	
	2/00			N	
A 6 1 K	7/00		7/16		
			47/10		
	7/16		47/26		
	47/10	A 6 1 P	3/00		
	47/26	C 1 2 N	9/10	Z N A	
// A 6 1 P	3/00	A 2 3 L	2/00	F	
C 1 2 N	9/10			G	
	Z N A				

(72)発明者 福田 恵温
 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式
 会社林原生物化学研究所内
 (72)発明者 三宅 俊雄
 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式
 会社林原生物化学研究所内

F ターム(参考) 4B017 LC04 LG02 LK11 LK12 LL02
 4B018 LE03 MD31 MD32 ME01 ME14
 MF10 MF12
 4B041 LC01 LC10 LE01 LK11 LK12
 4B047 LB09 LE06 LG15 LG21 LG25
 LG32
 4B050 CC01 DD02 FF04E FF05E
 FF11E FF14E LL01 LL02
 LL05
 4C057 AA04 BB01 BB04
 4C076 AA36 AA43 BB02 DD27 DD29
 DD38 DD67T EE30 EE30T
 FF36
 4C083 AB282 AC122 AC132 AC441
 AC442 AC782 AD211 AD212
 CC41 DD22 EE32